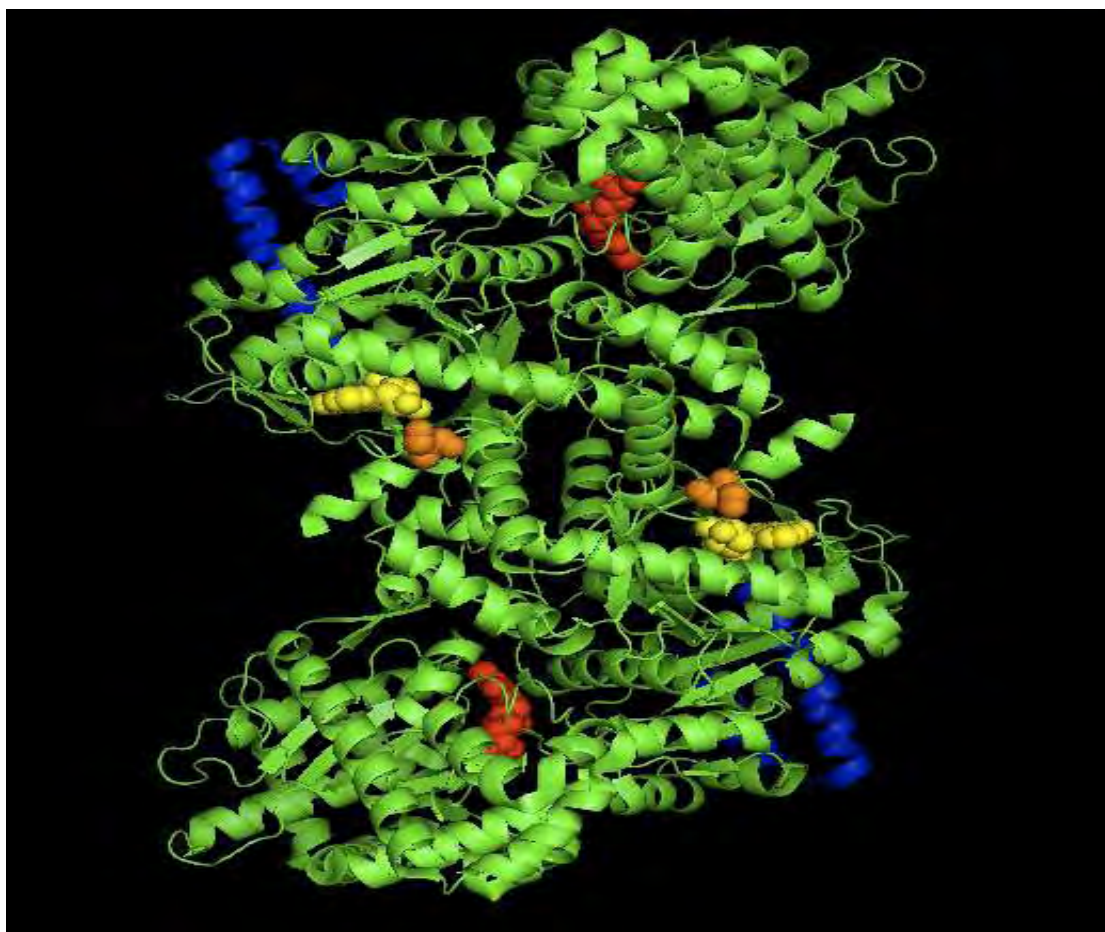




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ
ΠΑΡΑΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΡΟΔΙΟΥ ΚΑΙ ΑΜΠΕΛΟΥ ΜΕ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ**



ΣΤΡΑΒΟΔΗΜΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ
ΠΑΡΑΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΡΟΔΙΟΥ ΚΑΙ ΑΜΠΕΛΟΥ ΜΕ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ**

**ASSESSMENT OF POLYPHAINOLIC EXTRACTS FROM BYPRODUCTS OF THE
POMEGRANATE AND GRAPE INDUSTRIAL PROCESS FOR HYPOGLYCAEMIC
ACTIVITY BY BIOCHEMICAL METHODS**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

● **Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος (επιβλέπων)**

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

● **Δρ. Κοντού Μαρία**

Επίκουρος καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

● **Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία**

Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	5
Εισαγωγή.....	7
1. Σακχαρώδης διαβήτης.....	7
1.1.1 Δομή και Φυσιολογικός ρόλος ινσουλίνης.....	9
1.1.2 Υποϊνσουλινισμός.....	10
1.2.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου Ι.....	11
1.2.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου ΙΙ.....	12
1.3 Ομοιόσταση γλυκόζης και ο ρόλος της ινσουλίνης.....	13
1.4 Το ρυθμιστικό σύστημα γλυκόζης-ινσουλίνης.....	13
2. Βασικές γνώσεις.....	18
2.1 Γλυκόζη.....	18
2.2 Γλυκογόνο.....	19
2.2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου.....	20
2.2.2 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης.....	21
3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	23
3.1 Γενικά.....	23
3.2 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις.....	25
3.3 Κρυσταλλική δομή της GP.....	30
3.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	32
3.5 Φυτικά εκχυλίσματα ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα.....	33
3.5.1 Εκχυλίσματα σταφυλιών.....	34
3.5.2 Σταφύλια και υποπροϊόντα οινοποίησης.....	36
3.5.3 Εκχυλίσματα ροδιού.....	36
4. Αρχές κρυστάλλωσης πρωτεϊνών.....	38
4.1 Ιστορική αναδρομή.....	38
4.2 Φυσικοχημεία κρυστάλλωσης.....	39
4.3 Συνθήκες για κρυστάλλωση μακρομορίων.....	41
4.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών.....	44
4.5 Διαλύτης συγκρυστάλλωσης.....	46
4.6 Κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης.....	46
4.6.1 Γενικά.....	46
4.6.2 Βασικές αρχές.....	47
4.6.3 Ακτίνες X (Röntgen).....	54
4.6.4 Πηγές ακτίνων X και ανιχνευτές.....	56
4.6.5 Θεωρία περίθλασης ακτίνων X από κρύσταλλο.....	59
4.6.6 Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου.....	67
4.6.7 Έλεγχος του δομικού μοντέλου.....	69

Υλικά και μέθοδοι.....	71
1. Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μυς κουνελιού.....	71
2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου b.....	74
2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb.....	74
2.2 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m).....	75
2.3 Προσδιορισμός IC_{50} αναστολέα.....	76
2.3.1 Παρασκευή διαλύματος GPb- γλυκογόνου.....	77
2.3.2 Παρασκευή διαλύματος υποστρωμάτων.....	78
2.3.3 Εκτέλεση του πειράματος.....	79
2.4 Προσδιορισμός φωσφόρου.....	80
2.5 Παρασκευή τυφλών.....	81
2.6 Διαδικασία επεξεργασίας εκχυλισμάτων.....	81
2.7 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit	82
3. Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb.....	83
4. Σχηματισμός συμπλόκου κρυστάλλου- αναστολέα για κρυσταλλογραφική μελέτη.....	85
5. Έκθεση πρωτεϊνικού μονοκρυστάλλου σε ακτίνες X.....	86
6. Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	88
7. Κρυσταλλογραφική μελέτη της ουσίας	89
Σκοπός της εργασίας.....	95
Αποτελέσματα –Συζήτηση.....	94
1. Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου.....	94
2. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων.....	95
2.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	95
2.2 Κινητική μελέτη εκχυλίσματος παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού και παραπροϊόντων αμπελοκομίας.....	96
3. Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης.....	102
Περίληψη.....	111
Abstract.....	112
Βιβλιογραφία.....	113

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από το Μάρτιο του 2012 έως τον Ιούνιο του 2013, υπό την επίβλεψη του Αν. Καθηγητή Δρ. Λεωνίδα Δημήτρη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος, Δρ. Λεωνίδα Δημήτρη, που δέχτηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή του. Οι συμβουλές, η υπομονή, η ενθάρρυνση, η καθοδήγηση και η βοήθειά του καθ' όλη την διάρκεια υπήρξαν πολύτιμες. Μου έδωσε τη δυνατότητα να ζήσω και να εξοικειωθώ περαιτέρω με τις απαιτητικές συνθήκες ενός ερευνητικού εργαστηρίου βιοεπιστημών δίνοντας μου γνώσεις και εμπειρίες που θα μου φανούν ιδιαίτερα χρήσιμες για τη μετέπειτα επαγγελματική μου πορεία.

Αισθάνομαι, λοιπόν, την υποχρέωση να ευχαριστήσω ακόμη θερμά τους καθηγητές της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, Δρ. Κοντού Μαρία, Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία. Αρχικά για την εμπιστοσύνη αλλά και την πίστη που έδειξαν στο πρόσωπο μου για την εκπόνηση του θέματος, όπως και για τις πολύτιμες συμβουλές και καθοδήγηση για τη σωστή διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών. Δε θα μπορούσα βέβαια να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την υπέροχη συνύπαρξη, τη στήριξη και τη βοήθεια τους. Βέβαια ξεχωριστή θέση κατέχουν ιδιαιτέρως οι υποψήφιεσ διδάκτωρ κ.κ. Καντσάνδη Αναστασία και Χατζηλεοντιάδου Δήμητρα για την κάθε φύσης βοήθεια και στήριξη τόσο σε επιστημονικό όσο και σε ηθικό επίπεδο, καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες κ.κ. Μαραγκοζίδη Παναγιώτη, Κυρίτση Αθανάσιο και Γοργογιέτα Βύρωνα για την συμπαράσταση και στήριξη τους. Θα ήθελα να εκφράσω επίσης τις ευχαριστίες μου στον καθ. Χαρουτουγιάν Σ. και στο εργαστήριο του στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών για την προσφορά των εκχυλισμάτων των υποπροϊόντων οινοποίησης του *Vitis vinifera* και των εκχυλισμάτων παραπροϊόντων βιομηχανικής παραγωγής χυμού ροδιού ποικιλίας Wonderful.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου διότι χωρίς την ουσιαστική βοήθεια θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής. Η ηθική στήριξη σε όλα τα επίπεδα έκανε πάντα πιο εύκολο το ξεπέρασμα των δυσκολιών. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μπεχλιβανίδη Ιωάννα για την αμέριστη

συμπαράσταση που έδειξε σε κάθε λογής πρόβλημα κατά την διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας εργασίας.

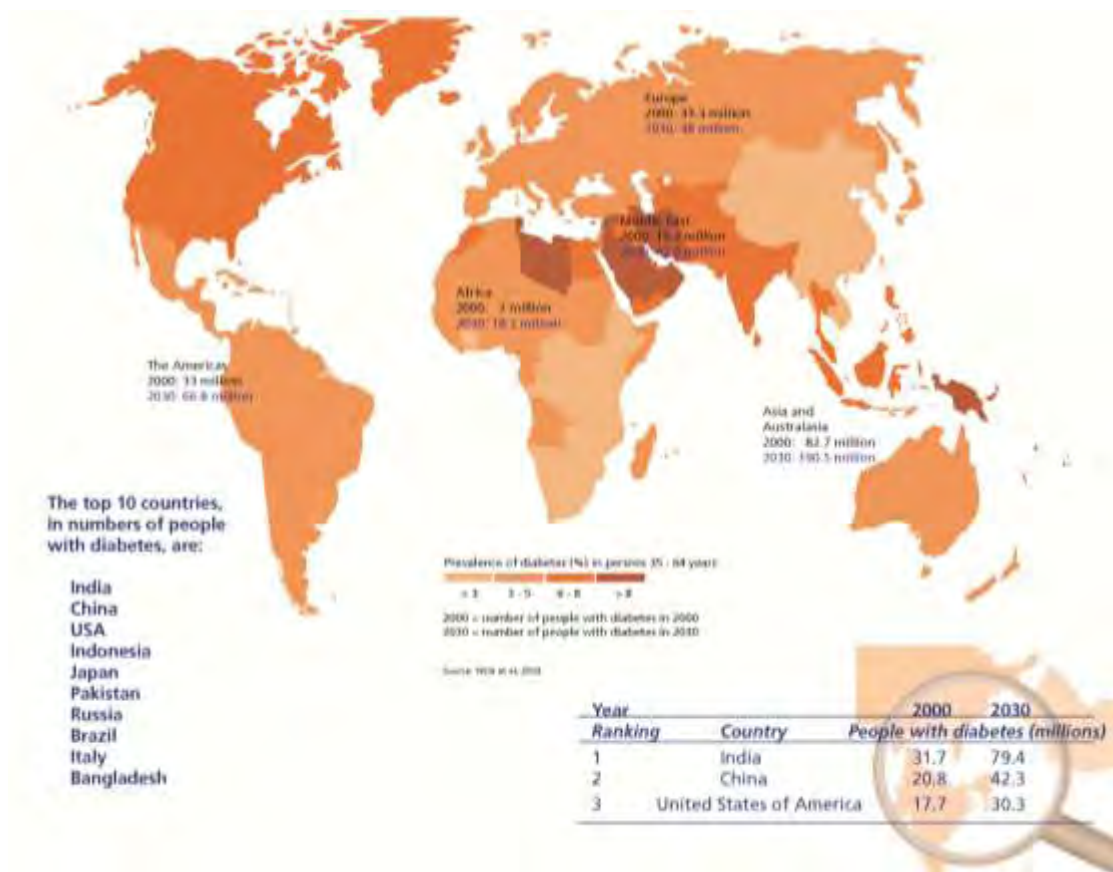
1. Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί ιατρικό πρόβλημα εδώ και 3500 χρόνια. Είναι μία πάθηση κατά την οποία το σώμα δεν παράγει ή δεν χρησιμοποιεί σωστά την ινσουλίνη. Η ινσουλίνη είναι μία ορμόνη που απαιτείται για τον μετασχηματισμό της ζάχαρης, του αμύλου και άλλων τροφών σε ενέργεια, απαραίτητη για καθημερινές ανάγκες. Οι ακριβείς αιτίες που προκαλούν το σακχαρώδη διαβήτη συνεχίζουν να παραμένουν ένα μυστήριο, αν και φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο για τη δημιουργία του, τόσο γενετικοί, όσο και περιβαλλοντικοί λόγοι, όπως η παχυσαρκία και η έλλειψη εξάσκησης. Η νόσος χαρακτηρίζεται από την αύξηση του σακχάρου του αίματος, με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση διάφορων επιπλοκών. Οι επιπλοκές αφορούν την καρδιά, τα αγγεία, τα μάτια, τους νεφρούς και το νευρικό σύστημα.

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια χρόνια πάθηση η οποία μπορεί να παραμένει «σιωπηλή» για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Τα υποκειμενικά ενοχλήματα των ασθενών, συχνά δε συνδέονται με τα ευρήματα του αντικειμενικού ελέγχου και η εξέλιξη της νόσου είναι απρόβλεπτη. Είναι μια νόσος που δεν μπορεί να ιαθεί οριστικά, μπορεί όμως να ελεγχθεί με τη βοήθεια της φαρμακευτικής θεραπείας αλλά και της πειθαρχίας από πλευράς του ασθενούς όσον αφορά τον τρόπο ζωής του. Η τέλεια ρύθμιση των επιπέδων σακχάρου στόχο έχει την πρόληψη τόσο των οξέων αλλά και των χρόνιων επιπλοκών της νόσου.

Υπολογίζεται λοιπόν, ότι σήμερα το 6,3% του πληθυσμού της γης πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη. Σε περίπου 13 εκατομμύρια άτομα από αυτούς ο σακχαρώδης διαβήτης έχει διαγνωστεί, ενώ περίπου 5,2 εκατομμύρια άτομα (δηλαδή το 1/3 από το τελικό ποσοστό) δε γνωρίζουν ότι έχουν την πάθηση. Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για το διαβήτη (IDF) 194 εκ. άνθρωποι υποφέρουν από σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως και αυτός ο αριθμός προβλέπεται να αυξηθεί σε 333 εκ. το 2025, κυρίως λόγω της γήρανσης του πληθυσμού, τις αλλαγές στον τρόπο ζωής και της καθιστικής ζωής. Στην Ευρώπη σύμφωνα με τα στοιχεία της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας, το 2000 υπήρχαν 33.3 εκ. άτομα με διαβήτη ενώ προβλέπεται ότι το 2030 ο αριθμός αυτός θα φτάσει τα 48 εκ. Στην Ελλάδα το ποσοστό του πληθυσμού που φαίνεται να πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη είναι περίπου 10%. Το 80% των ασθενών με

διαβήτη τύπου 2 είναι παχύσαρκοι και σύμφωνα με την επιδημιολογική μελέτη της Ελληνικής Εταιρίας Παχυσαρκίας, το 41% των ανδρών και το 30% των γυναικών είναι υπέρβαροι γεγονός που κατατάσσει τη χώρα μας στις πρώτες θέσεις στην ΕΕ κατανάλωσης φαρμάκων έναντι του σακχαρώδη διαβήτη. [Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας & Τεχνολογίας, <http://www.ifet.gr/diabetes2005IFET.pdf>]. Οι πρώτες δέκα χώρες σε αριθμό ασθενών με διαβήτη είναι οι εξής: Ινδία, Κίνα, ΗΠΑ, Ινδονησία, Ιαπωνία, Πακιστάν, Ρωσία, Βραζιλία, Ιταλία και Μπαγκλαντές. Στις χώρες αυτές ένας στους τέσσερις θανάτους σε άτομα ηλικίας 35 με 64 χρόνων, οφείλεται στο σακχαρώδη διαβήτη [World Health Organization-WHO, http://www.who.int/diabetes/BOOKLET_HTML/en/print.html] (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Η επιδημία του διαβήτη παγκοσμίως. [WHO, .Diabetes Action Now booklet]

1.1.1 Δομή και Φυσιολογικός ρόλος Ινσουλίνης

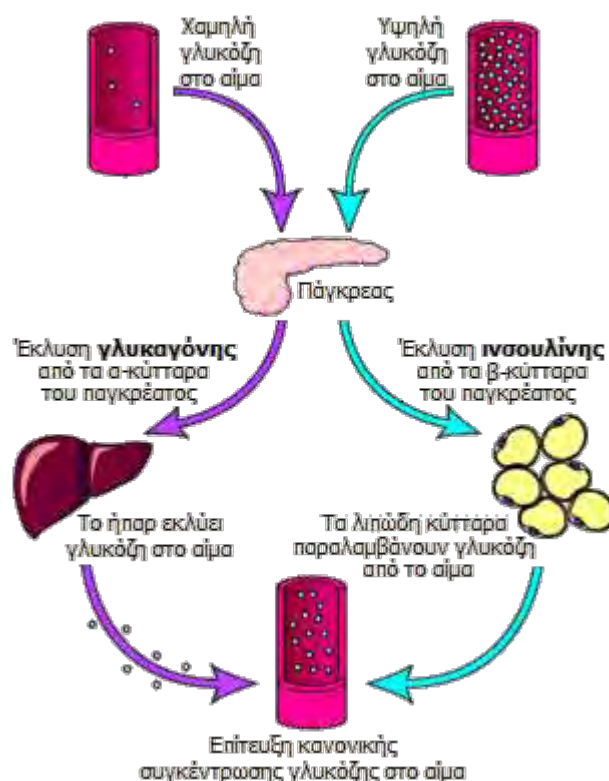
Η ινσουλίνη είναι μία μικρή πρωτεΐνη (η ανθρώπινη ινσουλίνη έχει μοριακό βάρος 5808 Da). Αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Όταν οι δύο αλυσίδες των αμινοξέων διαχωρίζονται, η λειτουργική δραστηριότητα του μορίου της ινσουλίνης μηδενίζεται.

Η ινσουλίνη συντίθεται από τα βήτα κύτταρα με το συνήθη κυτταρικό μηχανισμό της πρωτεϊνικής σύνθεσης, που αρχίζει με τη μετάφραση του RNA για την ινσουλίνη στα ριβοσώματα, που βρίσκονται προσκολλημένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, για τον σχηματισμό μιας προπροορμόνης της ινσουλίνης. Η αρχική αυτή προπροορμόνη έχει μοριακό βάρος 11.500 Da περίπου αλλά στη συνέχεια διασπάται στο ενδοπλασματικό δίκτυο για να σχηματίσει την προϊνσουλίνη, με μοριακό βάρος 9.000 Da περίπου, το μεγαλύτερο μέρος από αυτή υφίσταται περαιτέρω διάσπαση στη συσκευή Golgi, για να δώσει ινσουλίνη και πεπτιδικά τεμάχια πριν τη διαμερισματοποίηση της στα εκκριτικά κοκκία. Μολαταύτα, το 1/6 περίπου του τελικού προϊόντος που εκκρίνεται βρίσκεται ακόμα με τη μορφή προϊνσουλίνης. Η προϊνσουλίνη δεν έχει ορμονική δραστηριότητα.

Όταν η ινσουλίνη εκκρίνεται προς το αίμα, κυκλοφορεί σχεδόν αποκλειστικά ως ελεύθερη ινσουλίνη, η ημιζωή της στο πλάσμα είναι περίπου 6 λεπτά, και κατά συνέπεια αποσύρεται από την κυκλοφορία σε χρονικό διάστημα 10 έως 15 λεπτών. Εκτός από την ινσουλίνη που συνδέεται με υποδοχείς στα κύτταρα στόχους, η υπόλοιπη υφίσταται κυρίως διάσπαση από το ένζυμο ινσουλινάση στο ήπαρ και, σε μικρότερο βαθμό, στους νεφρούς, τους μυς και, σε ακόμα μικρότερο βαθμό σε άλλους ιστούς. Η ταχεία απομάκρυνση της ινσουλίνης από το πλάσμα είναι σημαντική, γιατί υπάρχουν περιπτώσεις που η ταχεία διακοπή των ρυθμιστικών επιδράσεων της ινσουλίνης είναι εξίσου αναγκαία όσο και η ταχεία εγκατάστασή τους.

Τέλος, η ινσουλίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση επιπλέον ενέργειας. Στην περίπτωση περίσσειας υδατανθράκων, προκαλεί την εναπόθεσή τους με τη μορφή γλυκογόνου, κατά κύριο λόγο στο ήπαρ και στους μυς. Προκαλεί επίσης εναπόθεση λίπους στον λιπώδη ιστό. Επίσης, όλη η περίσσεια των υδατανθράκων που δεν είναι δυνατόν να αποθηκεύονται ως γλυκογόνο, μετατρέπονται με την

επίδραση της ινσουλίνης σε λίπος, που επίσης εναποτίθεται στο λιπώδη ιστό. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών, η ινσουλίνη εξασκεί άμεση επίδραση, κατά την οποία ενισχύεται η πρόσληψη των αμινοξέων από τα κύτταρα και η μετατροπή τους σε πρωτεΐνη. Επιπρόσθετα η ινσουλίνη αναστέλλει τη διάσπαση των πρωτεϊνών που ήδη βρίσκονται μέσα στα κύτταρα [GUYTON & HALL].



Εικόνα 2. Φυσιολογική ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Όταν η συγκέντρωση γλυκόζης είναι αυξημένη στο αίμα, απελευθερώνεται από το πάγκρεας ινσουλίνη που κατευθύνεται στο ήπαρ. Η χαμηλή συγκέντρωση σακχάρου στο αίμα οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκαγόνης που λαμβάνεται από το πάγκρεας και το ήπαρ. Στο ήπαρ η γλυκαγόνη προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης [The important roles of insulin and glucagon: Diabetes and Hypoglycemia].

1.1.2 Υποϊνσουλινισμός

Η μείωση της διαθέσιμης ινσουλίνης στον οργανισμό μπορεί να οφείλεται σε καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, σε μειωμένη ανταπόκριση των β-κυττάρων, σε αντισώματα κατά της ινσουλίνης, σε αυξημένη αποδόμηση της στο ήπαρ αλλά και σε δομικές ανωμαλίες στο μόριο της ινσουλίνης.

Επίσης μπορεί να είναι μειωμένη η ανταπόκριση στην ινσουλίνη των κυττάρων «στόχου», που μπορεί να οφείλεται σε μείωση του διαθέσιμου αριθμού υποδοχέων ινσουλίνης, σε μειωμένη χημική συγγένεια μεταξύ ινσουλίνης και υποδοχέων ή σε κάποια ενδοκυτταρική ανωμαλία [Φυσιολογία Σμοκοβίτη 2004].

Η κλινική εικόνα από την ανεπάρκεια ινσουλίνης καλείται ως *σακχαρώδης διαβήτης*.

1.2 Τύποι σακχαρώδη διαβήτη

- **Ο νεανικός διαβήτης τύπου 1**: Η απόλυτη απουσία ινσουλίνης που συνήθως απορρέει από μια καταστροφική διαδικασία που απενεργοποιεί τα β-κύτταρα του παγκρέατος είναι η βασική αιτία του ΣΔ Τύπου 1 (ΣΔΤ1). Ο τύπος αυτός αποτελεί την κυριότερη αιτία διαβήτη σε παιδιά, μπορεί όμως να προσβάλλει και τους ενήλικες. Κατά τη διαδικασία αυτή παράγονται αντισώματα που στρέφονται εναντίον των β-κυττάρων και των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σύνθεση της ινσουλίνης. Μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστά τα αίτια που οδηγούν στην παραγωγή τέτοιου είδους αντισωμάτων. Η καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος είναι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων αυτοάνοσης αιτιολογίας. Για αυτό το λόγο ο ΣΔΤ1 δε μπορεί με την υπάρχουσα γνώση να προληφθεί ούτε να θεραπευτεί. Στη γένεση της νόσου έχει διαπιστωθεί ότι παίζουν ρόλο διάφοροι παράγοντες. Η κληρονομικότητα δε φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του ΣΔΤ1. Έρευνες σε παιδιά που πάσχουν έχουν δείξει ότι σε ποσοστό 85% τα παιδιά αυτά δε έχουν γονέα ή αδερφό που πάσχει από τη νόσο. Αντίστοιχα συμπεράσματα έχουν προκύψει και από έρευνες σε μονοζυγωτικούς διδύμους. Αντίθετα, ισχυρότερο ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν περιβαλλοντικοί παράγοντες τόσο της ενδομήτριας, όσο και της εξωμήτριας ζωής. Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων με ΣΔΤ1 ανιχνεύονται ένα ή περισσότερα είδη αυτοαντισωμάτων, τα άτομα δε αυτά εμφανίζουν αυξημένη προδιάθεση και για άλλες αυτοάνοσες παθήσεις. Παρόλα αυτά, σ' ένα μικρό ποσοστό ατόμων με ΣΔΤ1 δεν ανιχνεύονται αυτοαντισώματα, και ο τύπος αυτός ονομάζεται ιδιοπαθής ΣΔ. Τα άτομα που πάσχουν από ΣΔΤ1 χρειάζονται απαραίτητα εξωτερική χορήγηση ινσουλίνης. Για αυτό ο τύπος αυτός ονομάζεται και ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης [S.Wild et al., 2004] [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].

• **Ο διαβήτης τύπου 2**: Οι ασθενείς αυτοί είναι συνήθως μέσης ηλικίας ή ηλικιωμένοι και συχνά παχύσαρκοι. Εμφανίζουν διαταραχή τόσο στην έκκριση, όσο και στη δράση της ινσουλίνης, σε αναλογία που ποικίλλει από άτομο σε άτομο.

Συμβαίνει συχνά να υπάρχουν άνθρωποι που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη και να μην το γνωρίζουν, γιατί τα συμπτώματά τους φαίνονται ασήμαντα. Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει ότι η πρόωρη διάγνωση του σακχαρώδη διαβήτη από τα συμπτώματά του, μπορεί να μειώσει τις πιθανότητες εμφάνισης των επιπλοκών του. Τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 1 συνήθως εμφανίζονται απότομα και εξελίσσονται γρήγορα. Στο διαβήτη τύπου 2 τα συμπτώματα εμφανίζονται, συνήθως, σταδιακά και είναι βαθμιαία. Συχνά τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 2 λείπουν τελείως και ο ασθενής αισθάνεται υγιής.

Μερικά από τα συμπτώματα του σακχαρώδη διαβήτη είναι τα εξής:

- Συχνή ούρηση
- Υπερβολική δίψα
- Υπερβολική πείνα
- Ασυνήθιστη απώλεια βάρους
- Αυξημένη κόπωση
- Κνησμός
- Θαμπή όραση

Σε αντίθεση με άλλες παθήσεις ο σακχαρώδης διαβήτης δεν φαίνεται να είναι αυστηρά κληρονομικός. Βέβαια, υπάρχουν άνθρωποι, οι οποίοι λόγω κληρονομικότητας έχουν περισσότερες πιθανότητες να τον αποκτήσουν από ότι κάποιοι άλλοι.

Ο Διαβήτης Τύπου 1 και ο Διαβήτης Τύπου 2 έχουν διαφορετικές αιτίες. Υπάρχουν όμως δύο παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο και στις δύο περιπτώσεις. Ο πρώτος είναι η κληρονομική προδιάθεση στην πάθηση και ο δεύτερος οι περιβαλλοντικές συνθήκες που μπορεί να ωθήσουν προς εκείνη την κατεύθυνση.

Τα γονίδια από μόνα τους πάντως δεν προκαλούν σακχαρώδη διαβήτη. Μία απόδειξη αυτού είναι η περίπτωση των διδύμων. Οι δίδυμοι έχουν ίδια γονίδια. Όμως στις περιπτώσεις που ένας από τους διδύμους έχει Διαβήτη Τύπου 1, ο άλλος τον

παρουσιάζει μόνο κατά το 50%, δηλαδή τις μισές φορές. Στις περιπτώσεις που ένας από τους διδύμους έχει Διαβήτη Τύπου 2, ο άλλος τον παρουσιάζει κατά 75%, δηλαδή τις 3 από τις 4 φορές. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων κάποιος αποκτά Διαβήτη Τύπου 1, όταν υπάρχει προδιάθεση και από τους δύο γονείς του. Η προδιάθεση αυτή κατά πάσα πιθανότητα βασίζεται σε παράγοντες που αφορούν τους λευκούς, γιατί οι λευκοί παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά Διαβήτη Τύπου 1.

Όσον αφορά τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, έρευνες έχουν δείξει ότι έχουν να κάνουν κυρίως με το κρύο νερό. Ο Διαβήτης Τύπου 1 εμφανίζεται συχνότερα το χειμώνα από το καλοκαίρι και σε περιοχές με ψυχρά κλίματα από θερμά. Επίσης συγκεκριμένο ρόλο φαίνεται να έχουν οι ιοί. Ίσως ένας ιός που δεν έχει και πολύ σοβαρά συμπτώματα να επηρεάζει τον ανθρώπινο οργανισμό με τέτοιο τρόπο, ώστε να ενισχύει τον Διαβήτη Τύπου 1. Επίσης σημαντική είναι και η διατροφή κατά τη βρεφική ηλικία. Έχει διαπιστωθεί ότι οι άνθρωποι που τρέφονταν δια θηλασμού περισσότερο χρονικό διάστημα, έχουν μικρότερες πιθανότητες να εμφανίσουν Διαβήτη Τύπου 1.

Τέλος, έχει διαπιστωθεί από πειράματα, ότι οι άνθρωποι που είχαν χαμηλά ποσοστά αντισωμάτων στον οργανισμό τους στο παρελθόν, έχουν τώρα μεγαλύτερες πιθανότητες να εμφανίσουν Διαβήτη Τύπου 1. Ο Διαβήτης Τύπου 2 έχει ισχυρότερη γενετική βάση από τον Διαβήτη Τύπου 1, παρόλα αυτά κι αυτός εξαρτάται πολύ από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο δυτικός τρόπος ζωής, που ακολουθείται από κακή διατροφή κι ελάχιστη άσκηση, είναι αρκετά επιρρεπής προς τον Διαβήτη Τύπου 2. Αντίθετα οι άνθρωποι των χωρών εκείνων που δεν έχουν ακολουθήσει τον δυτικό τρόπο ζωής, δεν εμφανίζουν συχνά τον Διαβήτη Τύπου 2, ανεξάρτητα από την γενετική τους προδιάθεση. Η παχυσαρκία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες για την εμφάνιση του Διαβήτη Τύπου 2 [S. Wild et al., 2004] [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].

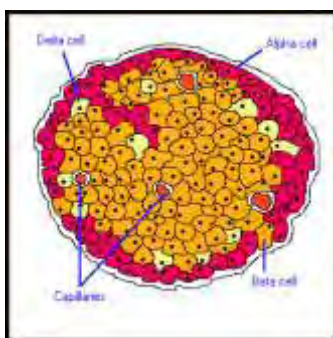
1.3 Ομοιότητα της γλυκόζης και ο ρόλος της ινσουλίνης

Για να διατηρηθεί το σωματικό βάρος σε σταθερά επίπεδα στο χρόνο, η εισαγωγή (intake) ενέργειας (κατανάλωση φαγητού) θα πρέπει να αντιστοιχεί στην κατανάλωση ενέργειας (το άθροισμα της εκκρινόμενης ενέργειας, των θερμικών απωλειών και της

φυσικής άσκησης). Οποιαδήποτε απόκλιση από αυτή την ισορροπία οδηγεί σε αύξηση ή απώλεια βάρους. Οι άνθρωποι και τα περισσότερα θηλαστικά λαμβάνουν ενέργεια μέσα από διακριτά επεισόδια (discrete episodes) ή γεύματα. Η κύρια πηγή ενέργειας είναι η γλυκόζη. Οι περισσότεροι υδατάνθρακες περιέχουν γλυκόζη είτε ως δομική μονάδα, όπως στο άμυλο, είτε σε συνδυασμό με άλλους μονοσακχαρίτες, όπως στη λακτόζη. Μετά τη διάσπαση των υδατανθράκων στο λεπτό έντερο, η γλυκόζη απορροφάται από τα κύτταρα του εντέρου και οδηγείται στο αίμα. Μέσω του αίματος μεταφέρεται στα κύτταρα όπου και χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενέργειας. Ωστόσο, η γλυκόζη δε μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα χωρίς την παρουσία της ορμόνης ινσουλίνης. Αν δεν υπάρχει η ινσουλίνη, τα κύτταρα δε λαμβάνουν γλυκόζη και άρα ενέργεια, παρά το γεγονός ότι αυτή βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο αίμα. Η «κίνηση» της γλυκόζης στον οργανισμό και η ταυτόχρονη διατήρηση της συγκέντρωσής της στο αίμα σε δεδομένα επιθυμητά επίπεδα (ομοιόσταση της γλυκόζης) είναι μια περίπλοκη διαδικασία που ελέγχεται από το ρυθμιστικό σύστημα γλυκόζης –ινσουλίνης [S. C. Woods et al., 2006] [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].

1.4 Το ρυθμιστικό σύστημα γλυκόζης- ινσουλίνης

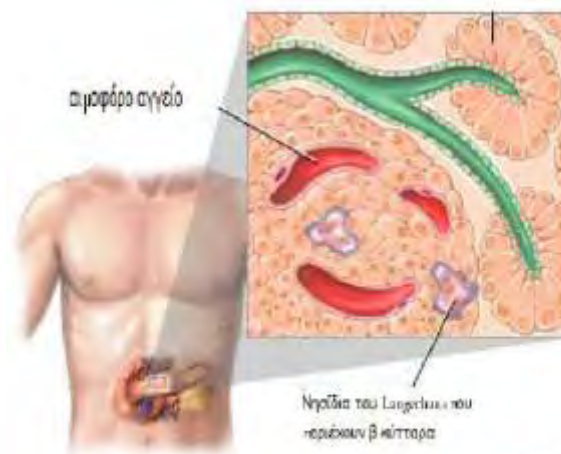
Η ενδοκρινής μοίρα του παγκρέατος αποτελείται από απομονωμένα νησίδια που ονομάζονται νησίδια του Langerhans (Εικόνα 3).



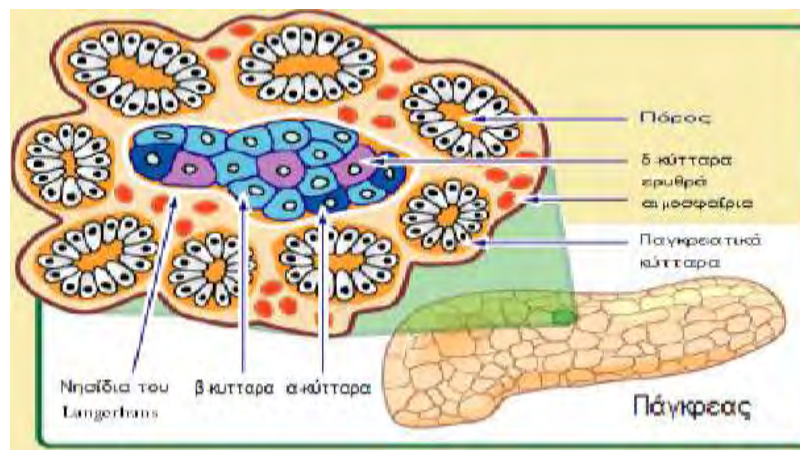
Εικόνα 3. Νησίδια του Langerhans

Στον ανθρώπινο οργανισμό τα νησίδια αυτά αριθμούν περίπου στο ένα εκατομμύριο, με συνολικό βάρος ιστού ένα γραμμάριο (Εικόνα 4). Τα περισσότερα νησίδια περιέχουν τουλάχιστον τρεις τύπους κυττάρων: α-κύτταρα που εκκρίνουν γλυκογόνο, β-κύτταρα που εκκρίνουν ινσουλίνη και δ-κύτταρα που εκκρίνουν σωματοστατίνη (Εικόνα 4). Τα β-κύτταρα αποτελούν το 80% του συνόλου των κυττάρων και βρίσκονται στο εσωτερικό των νησιδίων. Η περιφέρεια αποτελείται από α-κύτταρα,

ενώ στο εσωτερικό βρίσκεται κι ένας μικρός αριθμός δ-κυττάρων. Οι ορμόνες που παράγονται από τα κύτταρα των νησιδίων του Langerhans έχουν πολυάριθμες λειτουργίες, η κυριότερη ωστόσο είναι κατά γενική ομολογία η ομοιοστάση της γλυκόζης [S. C. Woods et al., 2006] [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].

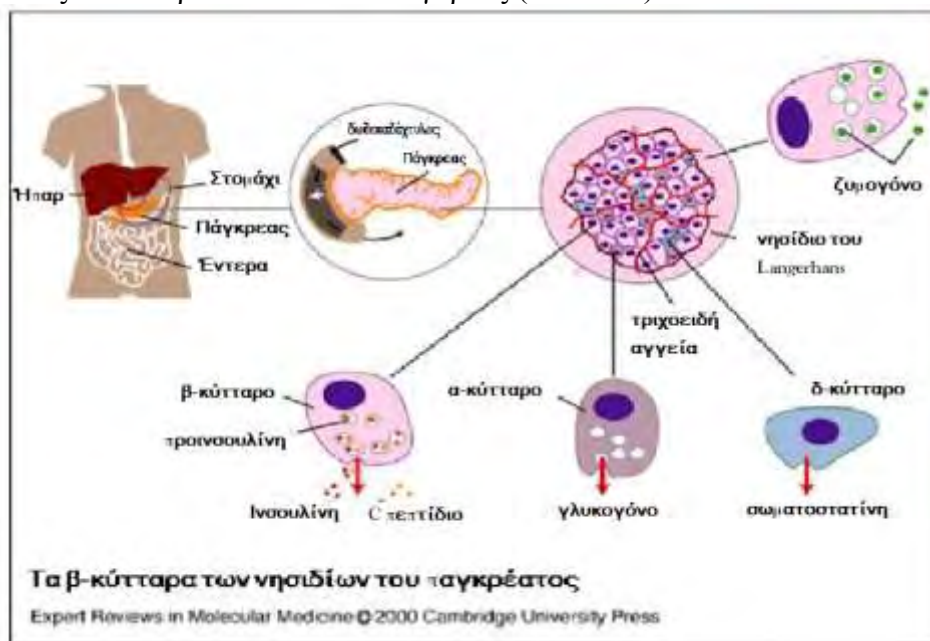


Εικόνα 3. Νησίδια του Langerhans στο ανθρώπινο πάγκρεας [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].



Εικόνα 4. Τύποι κυττάρων που περιέχονται στα νησίδια του Langerhans [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].

Οι ορμόνες που εκκρίνονται από το πάγκρεας (Εικόνα 5) είναι:



Εικόνα 5. Έκκριση ορμονών από το πάγκρεας, από κάθε είδος κυττάρων [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].

Ινσουλίνη

Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη με πολλαπλές δραστηριότητες. Επιδρά κυρίως στο ήπαρ, τους μύες και το λιπώδη ιστό.

Στο ήπαρ, η ινσουλίνη διαδραματίζει τέσσερις βασικούς ρόλους:

- Ενεργοποιεί την απορρόφηση της γλυκόζης μέσω της αποθήκευσής της συνθέτοντας γλυκογόνο και εμποδίζει τη γλυκογονόλυση, δηλαδή τη διάσπαση του γλυκογόνου και την απελευθέρωση της γλυκόζης. Το γλυκογόνο είναι βασική μορφή εναποθήκευσης της γλυκόζης στο ήπαρ αλλά και στους μύες. Η απελευθέρωση της γλυκόζης στα διαστήματα νηστείας προέρχεται από τη διάσπαση του γλυκογόνου
- Ενεργοποιεί την απορρόφηση της γλυκόζης μέσω της διάσπασής της σε πυροσταφυλικό οξύ, δηλαδή την οξείδωσή της για παραγωγή ενέργειας (γλυκόλυση) και εμποδίζει τη γλυκονεογένεση δηλαδή τη μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γλυκόζη.
- Ενισχύει τη λιπογένεση, την εναποθήκευση δηλαδή λίπους και την παραγωγή τριγλυκεριδίων και εμποδίζει τη λιπόλυση, τη διάσπαση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα.
- Ενισχύει το μεταβολισμό των πρωτεϊνών και μειώνει τη διάσπαση των πρωτεϊνών.

Στους μύες η ινσουλίνη προωθεί την πρόσληψη της γλυκόζης ενεργοποιώντας ινσουλινευαίσθητους μεταφορείς στην επιφάνειά τους, καθώς και την εναποθήκευσή της μέσω της μετατροπής της σε γλυκαγόνη και της οξείδωσής της. Επιπλέον,

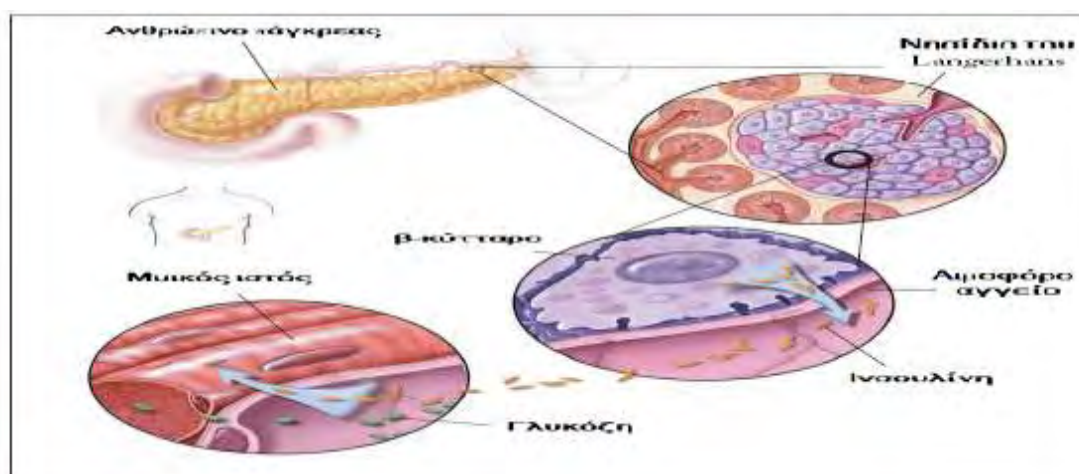
ενεργοποιεί, όπως και στο ήπαρ, τη σύνθεση πρωτεϊνών και την εναποθήκευση λίπους. Αντίστοιχη δράση παρουσιάζει και στα λιποκύτταρα. Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται ο ρόλος της ινσουλίνης και του γλυκογόνου και η επίδραση στους μύες και στους ιστούς του σώματος.

Τέλος, η ινσουλίνη εμποδίζει τη διαδικασία της κετογένεσης, της οξείδωσης δηλαδή των λιπαρών οξέων και της παραγωγής κετονικών σωμάτων.

Με λίγα λόγια, η ινσουλίνη ευνοεί αναβολικές διεργασίες οι οποίες λειτουργούν στην κατεύθυνση της πρόσληψης της γλυκόζης και της αποθήκευσης ενέργειας, πρωτεϊνών και λίπους [S. C. Woods et al., 2006] [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].

Γλυκαγόνη

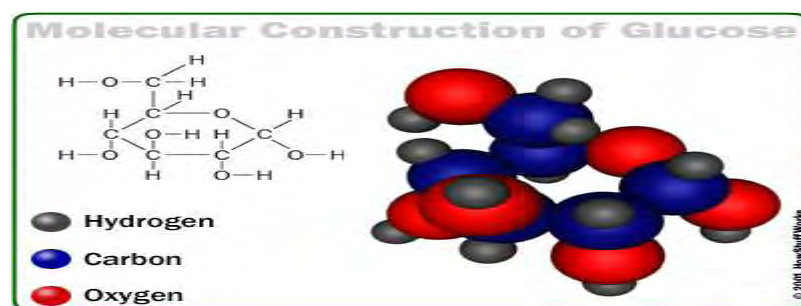
Η γλυκαγόνη παρουσιάζει αντίθετη συμπεριφορά. Κύριος ρόλος της είναι η παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ ενεργοποιώντας τη γλυκογονόλυση και εμποδίζοντας τη σύνθεση του γλυκογόνου. Επιπλέον, η γλυκαγόνη στο ήπαρ ενεργοποιεί την οξείδωση του λίπους για την παραγωγή ενέργειας (Εικόνα 5 και 6). Αν αυτό δεν είναι αρκετό, τα λιπαρά οξέα οξειδώνονται μερικώς για την παραγωγή κετονικών σωμάτων. Αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν από άλλους ιστούς ως «καύσιμο». Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι εκτός από τη γλυκόζη, τα κετοξέα είναι η μόνη πηγή ενέργειας που χρησιμοποιεί ο εγκέφαλος. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό ιδίως κατά τα διαστήματα μεταξύ των γευμάτων [S. C. Woods et al., 2006] [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].



Εικόνα 6. Η επίδραση της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης στους μύες και στους ιστούς του σώματος [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].

2.Βασικές γνώσεις

2.1. Γλυκόζη: Η γλυκόζη είναι μονοσακχαρίτης που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϋδική ομάδα του ανοικτού τύπου της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μία ενδομοριακή ακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο (Εικόνα 7). Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη [Stryer,1997].



Εικόνα 7. Απεικόνιση ενός μορίου γλυκόζης

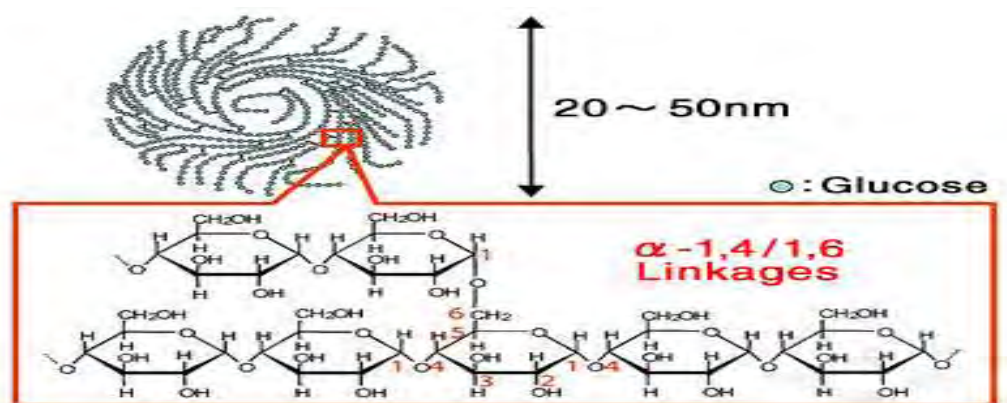
Υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων [McArdle *et al.*, 2000]. Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Η γλυκόζη αποτελεί το ενεργειακό υπόστρωμα για τον μεταβολισμό του εγκεφάλου και υπολογίζεται ότι το 60% περίπου της ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη, χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Έτσι ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ως βασικό καύσιμο υλικό, ενώ τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούν μόνο τη γλυκόζη ως καύσιμο. Επειδή η γλυκόζη διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, η πυκνότητά της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά την διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης [McArdle *et al.*, 2000]. Η συγκέντρωση της στο αίμα ποικίλλει από 80 έως 120 mg ανά 100 ml (4,4-6,7 mM). Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη [Stryer,1997].

Η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωσή της και την ορμονική κατάσταση του οργανισμού. Βασικός

συντελεστής για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει την γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωσή της στο αίμα αλλά ούτε και την παρουσία της ινσουλίνης, οι σκελετικοί μύες προσλαμβάνουν γλυκόζη μόνο με την βοήθεια της ινσουλίνης [McArdle et al., 2000].

Ακόμη το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει το αίμα με γλυκόζη μέσω των διαδικασιών της γλυκονεογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών, και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη [Martin et al., 1998]. Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από την δράση των επιμέρους ενζύμων, την συσσώρευση τελικών προϊόντων που μπορεί να δρουν και σαν αναστολείς καθώς και την διαιτητική κατάσταση του οργανισμού [McArdle et al., 2000].

2.2. Γλυκογόνο: Το γλυκογόνο είναι ένα πολύ μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές το οποίο αποτελείται από μόρια α-D-γλυκόζης και αποτελεί την κύρια πηγή αποθήκευσης της γλυκόζης στα θηλαστικά. Τα περισσότερα μόρια γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται μεταξύ τους με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι απαντώνται περίπου ανά δέκα μόρια γλυκόζης [Stryer, 1997].



Εικόνα 8. Η δομή του γλυκογόνου

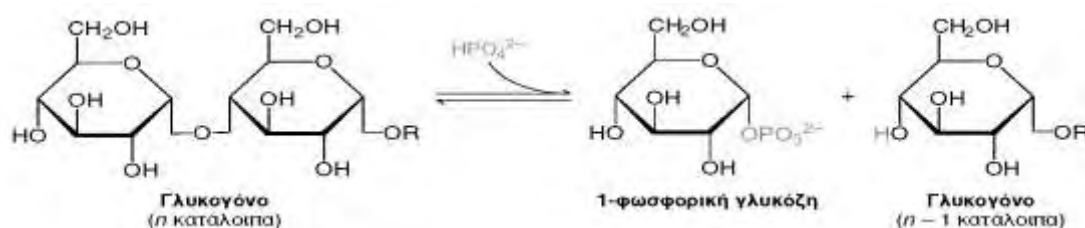
Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την

ποσότητα γλυκόζης που είναι διαθέσιμοι μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Επιπλέον η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι γραμμωτοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι γενικά μεγαλύτερη απ' ό,τι στους μύς, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο [Stryer 1997].

2.2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου: Η μεταβολική οδός της γλυκογονόλυσης μελετήθηκε διεξοδικά από τους Carl & Gerty Cori γύρω στο 1936. Το ζεύγος Cori απομόνωσε το ένζυμο φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP), το οποίο καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης στην διαδικασία της γλυκογονόλυσης [Cori & Cori, 1936]. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού αναφέρεται ως φωσφορόλυση (Εικόνα 9).

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση, απαιτείται ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, η γλυκοζιδάση α-1,6, καθώς και μια μεταφοράση. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και διατηρείται η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα [Stryer, 1997].

Γλυκογόνο (n κατάλοιπα) + Pi → 1-φωσφορική-γλυκόζη + γλυκογόνο (n - 1 κατάλοιπα)



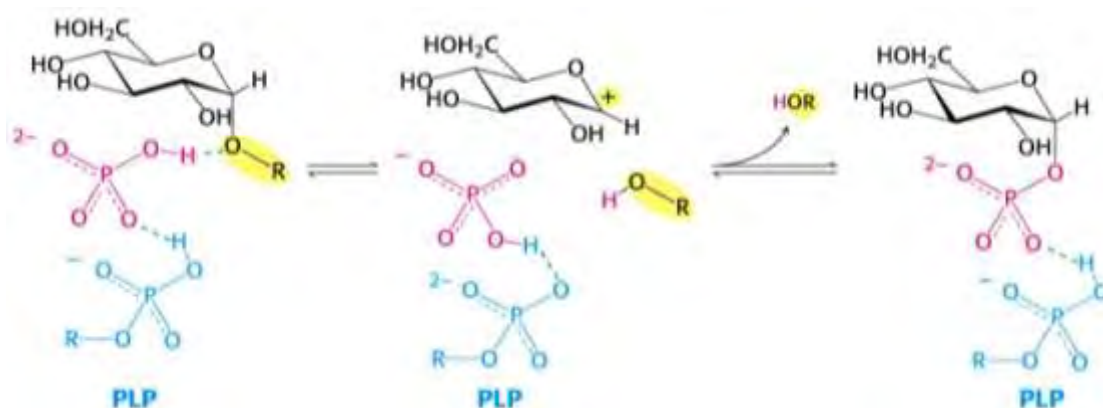
Εικόνα 9. Αποικοδόμηση γλυκογόνου [Stryer 1997]

Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3.6.

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη [Stryer, 1997].

2.2.2 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου: Η ιδιαίτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η φωσφορυλάση είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο [Stryer 1997]. Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β, δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη (Εικόνα 10) [Stryer, 1997].

Ενδιάμεσο καρβοκατιόντος



Εικόνα 10. Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Μια προσδεμένη ομάδα HPO_4^{2-} (κόκκινο) ευνοεί τη διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και ευνοείται με τη μεταφορά ενός πρωτονίου από την πρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα της δεσμευμένης φωσφορικής πυριδοξάλης (μπλε). Η σύζευξη του καρβοκατιόντος και του ορθοφωσφορικού έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης [Stryer, 1997].

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆). Η αλδεϋδική ομάδα αυτού του συνενζύμου σχηματίζει μια βάση Schiff με μια πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου (Εικόνα 11). Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α-1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης [Stryer, 1997].



Εικόνα 11. Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η PLP(κόκκινο) σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης (μπλε) στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης [Stryer, 1997].

3.Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

3.1 Γενικά

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του και ελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη.

Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών. Οι τρεις ισομορφές εμφανίζουν ομολογία στην αλληλουχία σε ποσοστό 80%. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση των μυών παρέχει ενέργεια στους μυς, η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών γι' αυτό στους ιστούς αυτούς απουσιάζει το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την ελευθέρωση της γλυκόζης, η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης [Stryer 1997].

Δομικά η GP είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα. Στους σκελετικούς μύες η GP βρίσκεται σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP, απ' ό τι σε όλα τα ένζυμα μαζί που εξαρτώνται από την βιταμίνη B₆. Με βάση διάφορα πειράματα που έγιναν στο παρελθόν αποδείχτηκε το γεγονός ότι η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP είναι απαραίτητη για την δραστικότητα του ενζύμου [Oikonomakos *et al.*, 1992]. Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, τις αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου.

Η κατάλυση της αντίδρασης φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από την GP γίνεται στο καταλυτικό της κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μία κοιλότητα που δημιουργείται ανάμεσα στην αμινο-τελική και την καρβοξυ-τελική περιοχή κάθε υπομονάδας. Στο ενεργό κέντρο τα υποστρώματα γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν έρχονται σε γειτνίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H₂O. Δύο είναι τα σημαντικότερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP. Το πρώτο είναι η διατήρηση της ανωμέρειας του γλυκογόνου στο προϊόν (1-φωσφορική α-D-γλυκόζη) (α-ανωμερές), που οφείλεται στο σχηματισμό του ανωμερικού καρβοκατιόντος και την κατάλληλα προσανατολισμένη (από κάτω) πυρηνόφιλη προσβολή του ορθοφωσφορικού ανιόντος. Το δεύτερο σημείο είναι η απαίτηση της παρουσίας του συνενζύμου, φωσφορική πυριδοξάλη που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την ε-αμινομάδα της λυσίνης 680. Σύμφωνα με μελέτες μηχανισμού της κατάλυσης της αντίδρασης φαίνεται το συνένζυμο να δρα σαν δότης αλλά και δέκτης πρωτονίων κατά την κατάλυση [McLaughlin 1984].

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρέπομενες μορφές : μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση b. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Το ρυθμιστικό ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση [Stryer 1997].

Φυσιολογικά η δραστικότητα της GP ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η κινάση μετά από ένα ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί

φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP_a (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G₁ (PP-G1) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP_b (μη φωσφορυλιωμένη GP) [Rath et al., 2000].

3.2 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις

Ο συντονισμός των ενζυμικών μηχανισμών και των αλληλεπιδράσεων που κατευθύνουν τις διάφορες διεργασίες γίνεται με την βοήθεια ρυθμιστικών ενζύμων, η λειτουργική δομή των οποίων τους επιτρέπει να προσαρμόζουν την καταλυτική τους δράση ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Σύμφωνα με τους Monod, Changeux και Wyman, ως αλλοστερικές χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες που διαθέτουν τουλάχιστον δυο διακριτά κέντρα σύνδεσης, το καταλυτικό και το αλλοστερικό. Στο καταλυτικό κέντρο, το οποίο ευθύνεται για την βιολογική δράση της πρωτεΐνης, συνδέεται το υπόστρωμα, ενώ στο αλλοστερικό συνδέεται αντιστρεπτά και με μεγάλη εξειδίκευση ένας άλλος μεταβολίτης, ο αλλοστερικός τροποποιητής. Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο-αλλοστερικός τροποποιητής προκαλεί μια διακριτή, αντιστρεπτή μεταβολή της μοριακής δομής της πρωτεΐνης, η οποία ονομάζεται **αλλοστερική μετάπτωση**. Αυτή τροποποιεί τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου, χωρίς να ενεργοποιεί κάποια αντίδραση που να εμπλέκει τον ίδιο τον τροποποιητή [Monod et al., 1963].

Γενικά, θεωρείται ότι η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει οποιαδήποτε αλλοστερική αλληλεπίδραση απορρέει αποκλειστικά από τη συγκεκριμένη δομή του ίδιου του μορίου της πρωτεΐνης. Αυτή η δομή είναι που του επιτρέπει να υποβληθεί σε μια ιδιαίτερη, διακριτή και αντιστρεπτή αλλαγή στη διαμόρφωσή του που επάγεται από τη σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή [Monod et al., 1963].

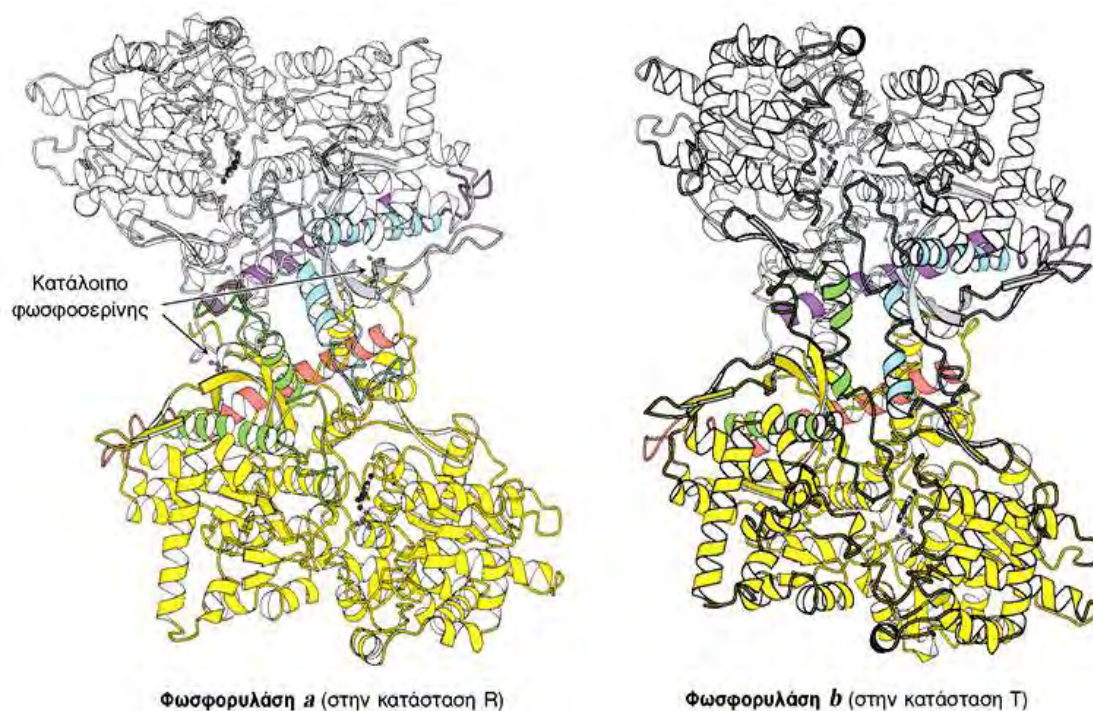
Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις διακρίνονται σε ομοτροπικές, μεταξύ ταυτόσημων ενώσεων και ετεροτροπικές, μεταξύ διαφορετικών ενώσεων. Η GP αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα αλλοστερικού ενζύμου. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι олиγομερή, τα μονομερή των οποίων συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε όλα να καταλαμβάνουν ισοδύναμες θέσεις. Δηλαδή, το μόριο να έχει έναν τουλάχιστον άξονα συμμετρίας. Το μονομερές απαντάται σε δυο τουλάχιστον πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, την T μορφή και τη R μορφή, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία που καθορίζεται από την αλλοστερική σταθερά L. Η συμμετρία στα μονομερή διατηρείται

κατά τη διάρκεια της αλλοστερικής μετάπτωσης από τη μια διαμόρφωση στην άλλη, ενώ η συγγενείά τους με συγκεκριμένους υποκαταστάτες μεταβάλλεται. Η σύνδεση του υποστρώματος σε οποιοδήποτε μονομερές δεν επηρεάζει κατά κανένα τρόπο την σύνδεσή του στα υπόλοιπα μονομερή (δηλαδή οι μικροσκοπικές σταθερές διάστασης στα σύμπλοκα μεταξύ μονομερών T ή R διαμόρφωσης και υποστρώματος είναι αντίστοιχα ίδιες) [Monod *et al.*, 1965].

Η παρουσία ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δυο διαμορφώσεων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ομοτροπικών και ετεροτροπικών αλληλεπιδράσεων. Οι θετικές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων στο ενζυμικό μόριο ερμηνεύονται με βάση τη μετατόπιση της ισορροπίας προς την κατεύθυνση της R διαμόρφωσης, η οποία συνδέει κατά προτίμηση το υπόστρωμα [Monod *et al.*, 1965].

Συνέπεια της σύνδεσης αυτής είναι η αύξηση ή αντίστοιχα η μείωση της αλλοστερικής σταθεράς και η τροποποίηση στη μορφή της γραφικής απεικόνισης της ενζυμικής ταχύτητας ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, σε περισσότερο ή λιγότερο σιγμοειδή. Η τροποποίηση αυτή γίνεται ανάλογα με το αν η αλλοστερική μετάπτωση προκαλείται από αναστολέα ή ενεργοποιητή του ενζύμου. Σημειώνεται ότι η σιγμοειδής συμπεριφορά αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των αλλοστερικών πρωτεϊνών [Monod *et al.*, 1965, Oikonomakos *et al.*, 1977].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Changeux και Wyman. Έτσι, κάθε μια από τις δύο μορφές της (a και b) βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για την φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T (Εικόνα 12). Η μετάβαση από την κατάσταση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση b) στην κατάσταση R (αντιπροσωπεύεται από την φωσφορυλάση a) συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α- έλικες, οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη [Stryer 1997].



Εικόνα 12. Δομή της φωσφορυλάσης *a* και της φωσφορυλάσης *b*. Η φωσφορυλάση *a* φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 14 κάθε υπομονάδας. Η τροποποίηση αυτή ευνοεί τη δομή της πλέον ενεργού κατάστασης R. Η μία υπομονάδα δείχνεται με λευκό, ενώ οι έλικες και οι θηλίες, που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση, με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα δείχνεται με κίτρινο και οι ρυθμιστικές δομές με πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση *b* δεν φωσφορυλιώνεται και υπάρχει κυρίως στην κατάσταση T [Stryer, 1997].

Η μυϊκή φωσφορυλάση *b* είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης *b* στην κατάσταση R. Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης *b* από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου [Stryer 1997]. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση *b* είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP. Αντίθετα η φωσφορυλάση *a* είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP και ATP. Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μυς εξασφαλίζει την παραμονή της 6-φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια.

Η δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται και από αναστολείς και αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο (Εικόνα 13). Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, φυσιολογικός αναστολέας, που

προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς την λιγότερο δραστική T διαμόρφωση. Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια (το τμήμα των βάσεων) προκαλώντας μπλοκάρισμα του καταλυτικού κέντρου μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την T διαμόρφωση. Τέλος, στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η 6-φωσφορική γλυκόζη προκαλώντας μετατόπιση προς την T κατάσταση, το AMP προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την R κατάσταση και το ATP που απλά ανταγωνίζεται το AMP [Oikonomakos 2001].

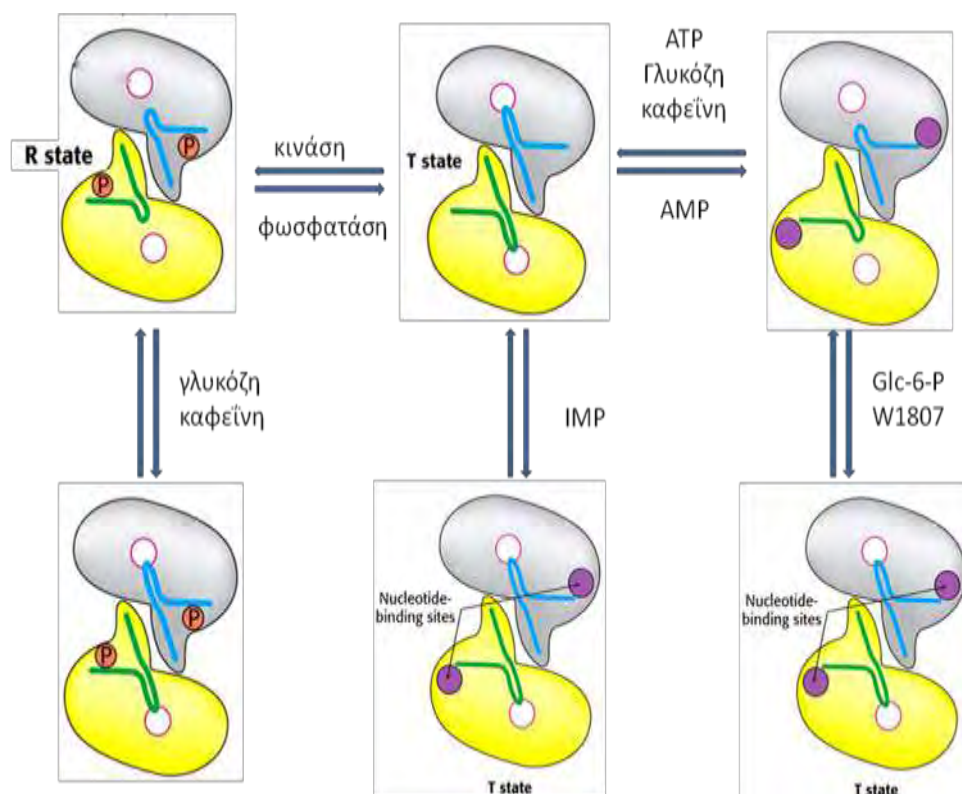


Εικόνα 13. Κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Οι αναστολείς είναι προσδεδμεμένοι στα κέντρα του ενζύμου, ενώ υποδεικνύεται και η θέση του βρόχου 280s.

Η ανενεργός μορφή της φωσφορυλάσης b μπορεί να ενεργοποιηθεί από την συνεργιστική σύνδεση του AMP και κάποιων αναλόγων του (όπως το IMP) και να ανασταλεί από το ATP, το ADP, την α-D-6-φωσφορική γλυκόζη (G6P), την UDP-

Glc, πουρίνες όπως η καφεΐνη και από την D-γλυκόζη. Υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων καθώς και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν *in vitro* να προκαλέσουν ενεργοποίηση του ενζύμου. Παρόμοια δράση ασκούν η πρωταμίνη, η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} [Oikonomakos *et al.*, 1992].

Η μετατροπή της GPb σε GPa έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP. Η GPa επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα ATP, ADP και την G6P (Εικόνα 14) [Johnson *et al.*, 1989].



Εικόνα 14. Ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης [Stryer 1997]

Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιόσταση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση α, αλλά όχι η β παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης α από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο,

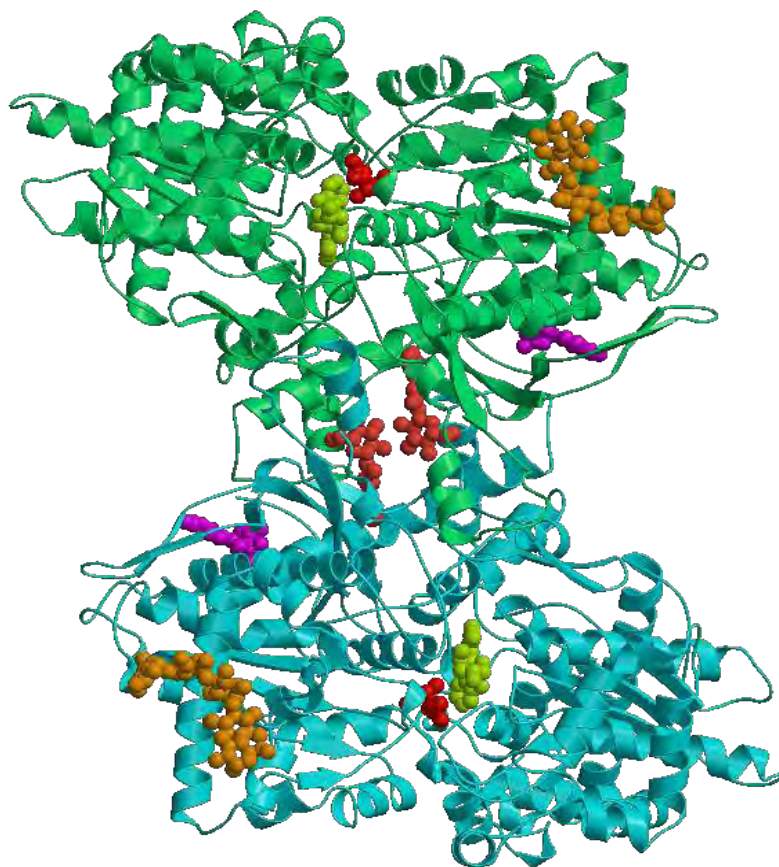
η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο [Stryer 1997].

3.3 Κρυσταλλική δομή της GP

Οι κρυσταλλικές δομές της GP_a και της GP_b (T και R διαμόρφωση) προσδιορίστηκαν γύρω στο 1990 [Barford & Johnson, 1989]. Οι μελέτες αυτές απέδειξαν πως οι κρύσταλλοι της GP περιέχουν μεγάλα ποσοστά ύδατος (γύρω στο 48%), το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. Κι αυτό συμβαίνει γιατί η διάταξη των κρυστάλλων των πρωτεϊνικών μορίων είναι τέτοια ώστε να δημιουργούνται επιμήκη κανάλια διαμέτρου 20 Å κατά μήκος του άξονα του κρυστάλλου. Τα κανάλια αυτά επιτρέπουν σε μικρά μόρια να διαχέονται στον κρύσταλλο και να φτάνουν στα κέντρα σύνδεσής τους [Barford & Johnson, 1989]. Βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν επίσης την ύπαρξη έξι κέντρων σύνδεσης:

- Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14 (P)
- Αλλοστερικό κέντρο (N)
- Καταλυτικό κέντρο (C)
- Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου) (G)
- Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής) (I)
- Νέο αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων)

Η κάθε υπομονάδα του διμερούς της GP έχει ελλειψοειδές σχήμα, με διαστάσεις 60x60x55 Å (Εικόνα 15). Η GP είναι μια α/β πρωτεΐνη και αποτελείται από α-έλικες (52%), β-ελάσματα (20%), δυο έλικες 3_{10} μήκους 6 και 12 αμινοξέων αντίστοιχα, και μια π έλικα μήκους 8 αμινοξέων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 αμινοξέα. Υπάρχει μια περιοχή 95 αμινοξέων (153-247) που αποτελείται μόνο από β-ελάσματα και μια άλλη 112 αμινοξέων (714-825) που αποτελείται μόνο από α-έλικες. Η αναδίπλωση των αμινοξέων γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε το μόριο να παρουσιάζει μια συμπαγή δομή ακτίνας 30 Å. Υπάρχουν μικρές περιοχές που προεξέχουν, καθώς και κανάλια που επιτρέπουν τη διέλευση των διαφόρων υποστρωμάτων και μικρών μορίων και βοηθούν στην επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων κέντρων σύνδεσης. Τέτοιες περιοχές σχηματίζονται από τα αμινοξέα 36-45 και 260-276, γνωστές ως επικάλυμμα (cap) και πύργος (tower) αντίστοιχα, όπως επίσης και ο βρόχος 280 (αμινοξέα 280-292) και το N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-18) [Oikonomakos *et al.*, 1992].



Εικόνα 15. Σχηματικό διάγραμμα του μονομερούς της GP. Οι περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που αντιστοιχούν στην α1 έλικα, στην περιοχή επικαλύμματος, στην αρχή της α2 έλικας και στην έλικα της περιοχής πύργος, ο βρόχος 280s και η αρχή της α8 έλικας μαζί με τον βρόχο που συνδέει τις διαμορφώσεις β7 και β8 είναι καθοριστικής σημασίας για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων. Το απαραίτητο συνένζυμο PLP είναι εγκλωβισμένο στο κέντρο της υπομονάδας, συνδεδεμένο με τη Lys680 της α21 έλικας. Το καταλυτικό κέντρο, που φαίνεται στο σχήμα μαζί με την G1P, βρίσκεται κοντά στο συνένζυμο και ο περιβάλλον διαλύτης έχει πρόσβαση σ' αυτό μέσω ενός καναλιού μήκους περίπου 15 Å. Το αλλοστερικό κέντρο, που είναι συνδεδεμένο με το AMP, εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δυο υπομονάδων, μεταξύ της α2 και της α8 έλικας. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, με πέντε μόρια σακχάρου συνδεδεμένα, συνδέεται με την α12 έλικα και είναι στην επιφάνεια του ενζύμου μακριά από το καταλυτικό και το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο του νουκλεοζιτικού αναστολέα βρίσκεται στην είσοδο του καναλιού του καταλυτικού κέντρου. Οι πουρίνες και τα νουκλεοτίδια που συνδέονται σε αυτό το κέντρο δημιουργούν αλληλεπιδράσεις με τη Phe285 από το βρόχο 280s και με την Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας. Η κατάληψη αυτού του κέντρου σταθεροποιεί την T διαμόρφωση και αναστέλλει την δράση του ενζύμου.

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να χωριστεί σε δυο αυτοτελείς περιοχές, την 1 και την 2. Η περιοχή 1, που ονομάζεται και ρυθμιστική, αποτελείται από τα αμινοξέα 10-484. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο φωσφορύλιωσης της Ser14, το αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης του AMP, το αποθηκευτικό κέντρο, οι περιοχές πύργος και επικάλυμμα καθώς και ένα τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η περιοχή 2, που ονομάζεται και καταλυτική, αποτελείται από τα αμινοξέα 485-842. Στην περιοχή

αυτή βρίσκεται το κέντρο αναστολής, η PLP και το υπόλοιπο τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση διαφόρων τροποποιητών και υποστρωμάτων οδηγεί στην εμφάνιση συνεργιστικής δράσης (θετικής ή αρνητικής) μεταξύ των κέντρων σύνδεσης, όχι μόνο στην ίδια υπομονάδα αλλά και μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων [Fletterick & Madsen, 1980].

3.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Βιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η φωσφορυλάση γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για την θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 [Oikonomakos 2001]. Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης, καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP χρησιμοποιείται σαν στόχος για την παρασκευή αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας [Oikonomakos, 2002].

Ωστόσο η ύπαρξη των τριών ισομορφών (της ηπατικής, της μυϊκής και του εγκεφάλου) της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, θέτει το ζήτημα της επιλεκτικότητας των φαρμάκων για αναστολή. Συγκεκριμένα για την μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, οι αναστολείς θα πρέπει να στοχεύουν στο ισοένζυμο του ήπατος χωρίς να επηρεάζουν τις δυο άλλες ισομορφές [Somsak et al., 2008]. Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP, μπορεί να μην είναι δυνατή η ακριβής στόχευση μόνο της ηπατικής ισομορφής. Παρόλα αυτά, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο έκθεσης σε φάρμακα τα οποία λαμβάνονται δια στόματος, θα πρέπει να είναι δυνατόν να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση φαρμάκου που θα στοχεύει κυρίως στο ήπαρ [Oikonomakos et al., 2008].

Ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου είναι πιθανό να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης της μυϊκής GPb από κουνέλια (η οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP) που μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει προσδιορισθεί σε υψηλή ευκρίνεια. Το σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιοριστεί. Η δομή του

παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1). Έτσι, έχει συντεθεί ένας αριθμός τέτοιων ενώσεων για τις οποίες αναμένονταν να καταλαμβάνουν διαμορφώσεις με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης και στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη GP. Έχουν πραγματοποιηθεί επίσης αναλύσεις με ακτίνες X για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι παρατηρούμενοι τρόποι σύνδεσης των ενώσεων ήταν γενικά κοντά σε αυτούς που είχαν προβλεφθεί, αλλά η συγγένεια σύνδεσης δεν ήταν καλύτερη απ' αυτή που μετρήθηκε για τη γλυκόζη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρείχαν κατευθυντήριες γραμμές για το σχεδιασμό περισσότερο ισχυρών αναστολέων [Blundell et al., 2002].

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP. Εάν θεωρηθεί ότι η δόση για ένα μέσο ενήλικα είναι 300 mg, τότε απαιτείται ένας αναστολέας με $K_i \approx 1 \mu\text{M}$, ώστε να μπορεί να μιμηθεί τη δράση 30-50 mM γλυκόζης [Witters & Avruch, 1978] στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Ο υπολογισμός υποθέτει πως το σύνολο του φαρμάκου φτάνει στο στόχο του. Αν όμως ληφθεί υπ' όψη η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου τότε απαιτείται αναστολέας με $K_i \approx 0.1 \mu\text{M}$.

3.5 Φυτικά εκχυλίσματα ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά σκευάσματα

Τα εκχυλίσματα σταφυλιών, το κρασί, το ρόδι και τα παράγωγά του (χυμός) έχουν μελετηθεί στο παρελθόν ως προς τις ευεργετικές τους δράσεις στην ανθρώπινη υγεία [Haroutanian et al., 2013]. Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με τις πιθανές ευεργετικές πολυφαινολικών εκχυλισμάτων υποπροϊόντων οινοποιίας σταφυλιού και προϊόντα και παραπροϊόντα της βιομηχανικής παραγωγής χυμού από το φυτό ροδιά στην αντιμετώπιση του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2.

3.5.1 Εκχυλίσματα σταφυλιών

Υπάρχουν λίγες σχετικά μελέτες για εκχυλίσματα από στελέχη σταφυλιού. Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σε εκχυλίσματα που προέρχονται από ελληνικές ποικιλίες *Vitis vinifera*.

- για την εκτίμηση του συνόλου του πολυφαινολικού περιεχομένου (TPC)

- για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών που υπάρχουν σε αυτά
- για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης
- για την προστασία έναντι ROS επαγόμενης βλάβης του DNA
- για την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2), και του τραχήλου της μήτρας (HeLa).

Το *Vitis vinifera* (σταφύλι), μία από τις μεγαλύτερες καλλιέργειες στον κόσμο, και το κρασί ήταν μέρος της ανθρώπινης διατροφής από την αρχαιότητα. Εκτιμάται ότι τα συνολικά ποσά της παραγωγής σταφυλιών ήταν πάνω από 60 εκατομμύρια τόνους. Κατά τα τελευταία χρόνια, εκχυλίσματα σταφυλιών και κρασί αποτελούν το κέντρο της προσοχής πολλών μελετών σχετικά με τις ευεργετικές επιδράσεις τους ανθρώπινη υγεία. Για παράδειγμα, ερευνητικές ομάδες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα σταφυλιών παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και εμπόδισαν αντιδρώντα είδη οξυγόνου (ROS) που προκαλούν βλάβη του DNA. Όπως είναι γνωστό, η υπερβολική παραγωγή των ROS στα οργανισμό μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά από εκφυλιστικές ασθένειες όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, αλλά και η πρόωρη γήρανση και η βλάβη του DNA [Haroutanian et al., 2013].

Διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για τις προστατευτικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων των σταφυλιών, όπως είναι η επαγωγή της απόπτωσης μέσω της διαφοροποίησης των ρυθμιστών τόσο της σηματοδότησης των κυττάρων όσο και του κυτταρικού κύκλου, η αναστολή των ενζύμων με καθοριστικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (π.χ. ανθρώπινη τοποϊσομεράση Ι) και η αναστολή της αγγειογένεσης. Επιπλέον, εκχυλίσματα σταφυλιών εμφανίζονται να προλαμβάνουν την εμφάνιση καρδιαγγειακών νόσων, όπως επίσης και να παρουσιάζουν αντιμικροβιακή, αντιυπερτασική, και κατά του έλκους δραστηριότητα.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα συμπληρώματα διατροφής που αναφέρονται ως «εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού» καταναλώνονται σε όλο τον κόσμο λόγω των ευεργετικών τους ιδιοτήτων στην ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες που αφορούν σταφύλια, αναφέρονται σε εκχυλίσματα από τη φλούδα, τους σπόρους, τον χυμό και το πυρηνέλαιο. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν μόνο λίγες μελέτες που

να αναφέρονται σε εκχυλίσματα από σπόρους, τσαμπιά και στέμφυλα, ελάχιστα μελετημένα υποπροϊόντα που παράγονται σε μεγάλες ποσότητες (περίπου 5% του αρχικού σταφυλιού) κατά τη διάρκεια της διαδικασίας οινοποίησης, καθιστώντας την εκμετάλλευσή τους ενδιαφέρον στόχο της έρευνας. Για παράδειγμα, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι μίσχοι των σταφυλιών είναι πλούσιοι σε πολυφαινόλες, όπως φλαβονοειδή, στυλβένια, και φαινολικά οξέα, τις πιο σημαντικές φυτοχημικές ενώσεις που βρίσκονται στα σταφύλια. Υποπροϊόντα σταφυλιού που προέρχονται από τη διαδικασία οινοποίησης χρησιμοποιούνται συνήθως για εκτροφή των ζώων και για παρασκευή φυσικών οργανικών λιπασμάτων (κομποστοποίηση) που αποτελούν διαδικασίες περιορισμένου οικονομικού ενδιαφέροντος. Επιπλέον, τα απόβλητα οίνου, προκαλούν περιβαλλοντικά προβλήματα, με αποτέλεσμα η ενδεχόμενη εκμετάλλευση τους ως συμπληρώματα διατροφής ή ως μια πηγή υψηλής προστιθέμενης αξίας σε πολυφαινόλες είναι ιδιαιτέρως ενδιαφέρουσα λόγω του ότι συνδυάζει ένα κερδοφόρο εγχείρημα με την προστασία του περιβάλλοντος στις ζώνες παραγωγής κρασιού.

Όπως είναι γνωστό, η γεωγραφική περιοχή, συμπεριλαμβανομένων των εδαφικών και κλιματικών συνθηκών, επηρεάζει το φαινολικό περιεχόμενο των σταφυλιών, λόγω της επιρροής τους στη βιοχημική σύνθεση των ενώσεων αυτών, και κατά συνέπεια των βιολογικών τους ιδιοτήτων. Ως εκ τούτου καθίσταται σαφές πως η έρευνα των τοπικών ποικιλιών είναι καίρια και καθοριστική [Haroutanian et al., 2013].

3.5.2 Σταφύλια και υποπροϊόντα οινοποίησης

Αφαιρέθηκαν χειροκίνητα οι βλαστοί και οι σπόροι από τους καρπούς του σταφυλιού (ρώγες), οι καρποί ζυγίστηκαν, αποξηράνθηκαν μέσω ψύχους (freeze-dried), επεξεργάστηκαν μηχανικά ώστε να αλεσθούν (millpowdered), και τα εκχυλίσματα σε μορφή σκόνης πλέον αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη. Βόστρυχοι και γίγαρτα (κοτσάνια και σπέρματα) ελήφθησαν άμεσα μέσω χειροκίνητου διαχωρισμού κατά τη διάρκεια των διαδικασιών αποβοστρύχωσης και εκκοκκίσεως. Αυτά τα δείγματα αποξηράνθηκαν μέσω αέρα, επεξεργάστηκαν μηχανικά ώστε να αλεσθούν, και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου [Haroutanian et al., 2013].

3.5.3 Εκχυλίσματα ροδιού

Η Ροδιά παρουσιάζεται ως το παλαιότερο, καλλιεργημένο καρποφόρο δέντρο από το 3000 π.χ και οι καρποί της χρησιμοποιούνταν στην αρχαιότητα για τις θεραπευτικές ιδιότητες που διαθέτουν. Αυτό το φρούτο αναφέρεται ως σύμβολο της καλοτυχίας, της ευημερίας, της αφθονίας, της γονιμότητας και ως θεραπευτικό σε διάφορους πολιτισμούς και θρησκείες. Η ονομασία ρόδι προέρχεται από τη βοτανική ονομασία *PUNICA GRANATUM* που μεταφράζεται ως ‘Μήλο με πολλούς καρπούς – σπόρια’ [Gatsios., 2010].

Το φυτό είναι θάμνος και ανήκει στην οικογένεια *Punicaceae*. Προέρχεται από την Ασία (Ιράν και Βόρεια Ινδία) αλλά έχει καλλιεργηθεί χιλιάδες χρόνια και στη Μεσόγειο. Η πιο εμπορική ποικιλία στην Ελλάδα είναι η Wonderful η οποία προέρχεται από τη Φλόριντα των Η.Π.Α. Σύμφωνα με εκτιμήσεις το σύνολο της παγκόσμιας παραγωγής τα τελευταία χρόνια ανέρχεται σε 2.250.000 τόνους. Τα τελευταία χρόνια, αν και δεν υπάρχουν ακριβή στατιστικά στοιχεία φαίνεται ότι οι καλλιεργούμενες εκτάσεις ροδιάς έχουν αυξηθεί σημαντικά [Pradeepkumar et al., 2008]. Σύμφωνα με κλινικές και επιστημονικές μελέτες, έχει αποδειχτεί ότι η κατανάλωση ροδιού έχει σημαντική ευεργετική επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό. Το ρόδι λόγω των συστατικών του προστατεύει τον ανθρώπινο οργανισμό και συμβάλει στην προστασία του καρδιαγγειακού συστήματος, στην μείωση των συμπτωμάτων κατάθλιψης και απώλειας οστικής μάζας κατά την εμμηνόπαυση, την καταπολέμηση της υπέρτασης και την προστασία από εγκεφαλικές βλάβες, την αποτροπή της ανάπτυξης καρκινικών όγκων, της οξειδωσης της LDL και της αρτηριοσκλήρωσης, την καλή υγεία, ευεξία και προστασία του δέρματος (αντιγηραντικές ιδιότητες), αλλά έχει και αντιδιαβητική, αντιϊκή και αντιμυκοτοκτόνο δράση. Επίσης έχει παρατηρηθεί πως ο χυμός του ροδιού καθώς και τα έλαια των σπόρων έχουν αντιμικροβιακές δράσεις και βοηθούν στην καταπολέμηση φλεγμονών. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η περιεκτικότητα του χυμού του ροδιού σε αντιοξειδωτικά είναι τρεις φορές υψηλότερη από το πράσινο τσάι και το κόκκινο κρασί.

Βιταμίνες A,C,E, σίδηρο, κάλιο, φυτικές ίνες, υδατάνθρακες αλλά και αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως τανίνες, πολυφαινόλες, ανθοκυανίνες και τόσα ακόμα

πολύτιμα συστατικά χαρακτηρίζουν τη σύσταση του ροδιού. Παρακάτω σε σχετικό πίνακα απαριθμούνται τα συστατικά του και η θρεπτική τους αξία.

4. Αρχές κρυστάλλωσης πρωτεϊνών

4.1 Ιστορική αναδρομή

Η ανακάλυψη της περίθλασης των ακτίνων-Χ σημείωσε τη γέννηση της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ, μεθοδολογίας που χρησιμοποιεί τα διαγράμματα περίθλασης για την αποκάλυψη των ατομικών θέσεων σε ένα κρύσταλλο. Αρχικά έγιναν μελέτες κρυστάλλων απλών ανόργανων ενώσεων, όπως του NaCl. Κατόπιν η μέθοδος επεκτάθηκε στη μελέτη ορυκτών και σχετικά απλών οργανικών μορίων και αργότερα στον καθορισμό της δομής πολύπλοκων οργανικών μορίων με βιολογική σημασία.

Η επιτυχία της εφαρμογής της μεθόδου στα βιολογικά μόρια στη δεκαετία 1950-60, έπαιξε σπουδαίο ρόλο στις θεαματικές προόδους που σημειώθηκαν τελευταία στο πεδίο της Μοριακής Βιολογίας. Συγκεκριμένα:

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης με ακτίνες-Χ κρυσταλλικών δομών μονοκρυστάλλων αμινοξέων πεπτιδίων, οι Pauling και Corey το 1951 πρότειναν την α-έλικα σαν τη βασική δομή μιας ομάδας ινωδών πρωτεϊνών που βρίσκονται στα μαλλιά, στους μυς, στο δέρμα και στο αίμα. Ο Astbury, νωρίτερα, από τις μελέτες με περίθλαση ακτίνων-Χ είχε υποδείξει την ομοιότητα της δομής των μελών της ομάδας.

Το 1953 ο Perutz και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν ότι η ισόμορφη προσκόλληση «βαριών» ατόμων σε μόρια αιμοσφαιρίνης, σε μονοκρυστάλλους, προκαλούσε μεταβολές στις εντάσεις των περιθλωμένων ακτίνων-Χ που μπορούσαν να μετρηθούν. Αυτή η σπουδαία ανακάλυψη έδειξε ότι ήταν δυνατό, κατ' αρχή, να καθοριστεί η δομή μιας σφαιρικής πρωτεΐνης. Εφαρμογή της μεθόδου στη μυοσφαιρίνη από τον Kendrew και τους συνεργάτες του (1957) είχε σαν αποτέλεσμα τον πρώτο καθορισμό της τρισδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης.

Ένα από τα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά της δομής ήταν οι περιοχές που παρουσίαζαν τη δομή της α-έλικας που επιβεβαίωναν πειραματικά την υπόθεση της ύπαρξης α-ελικών και σε σφαιρικές πρωτεΐνες. Τον προσδιορισμό της δομής της

μυοσφαιρίνης ακολούθησε ο προσδιορισμός της δομής της αιμοσφαιρίνης από τον Perutz και τους συνεργάτες του (1959). Λίγο αργότερα (1966) ο Philips και οι συνεργάτες του προσδιόρισαν για πρώτη φορά τη δομή ενός ενζύμου, της λυσοζύμης, και πρότειναν ένα μηχανισμό για την καταλυτική του δράση.

Το 1953 οι Watson και Crick πρότειναν τη σήμερα περίφημη δομή της διπλής έλικας για το μόριο του DNA. Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που οδήγησαν σ' αυτή την πρόταση υπήρξαν οι μελέτες με περίθλαση ακτίνων-X του DNA που έγιναν από τους Wilkins και Franklin. Η λεπτομερής ανάλυση των διαγραμμάτων περίθλασης από τον Wilkins και τους συνεργάτες του από τότε, επιβεβαίωσε την δομή των Watson και Crick, (β-DNA) και πιο πρόσφατα την τελευταία δεκαετία, η λύση της δομής πολυνουκλεοτιδίων επιπλέον πιστοποίησε την ύπαρξη αριστερόστροφου DNA, του Z-DNA.

Η περίθλαση ακτίνων-X έδωσε πολύτιμες πληροφορίες για τη δομή των ιών. Τις κλασσικές μελέτες στον ιό της μωσαϊκής του καπνού από τους Bernal και Fankuchen, το 1941, ακολούθησαν εκείνες των:

- Watson (1954) που έδειξε ότι ο ιός έχει ελικοειδή συμμετρία
- Caspar (1956) που έδειξε ότι έχει μια κεντρική οπή
- Franklin (1956) που καθόρισε τη θέση του RNA στον ιό.\

Το ενδιαφέρον στη δομή των ιών στράφηκε μετά από πρόταση των Crick και Watson (1956) ότι πρέπει να έχουν εικοσαεδρική συμμετρία.

Μελέτες που έγιναν από τους Caspar (1956) και Klug (1957) με περίθλαση ακτίνων-X έδωσαν την πρώτη πειραματική επιβεβαίωση αυτής της πρότασης. Παρ' όλα αυτά ο λεπτομερής καθορισμός της δομής των ιών παραμένει ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που αντιμετωπίζει η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X.

Πρόσφατα, πολύτιμες πληροφορίες για τη δομή των μεμβρανών πάρθηκαν από μελέτες με περίθλαση ακτίνων-X και η περίθλαση νετρονίων, που οι γενικές αρχές της μοιάζουν με τις αρχές της περίθλασης ακτίνων-X, δίνει σημαντικά αποτελέσματα για τη δομή των ριβοσωμάτων και της χρωματίνης [Σ. Χαμόδρακας,1993]

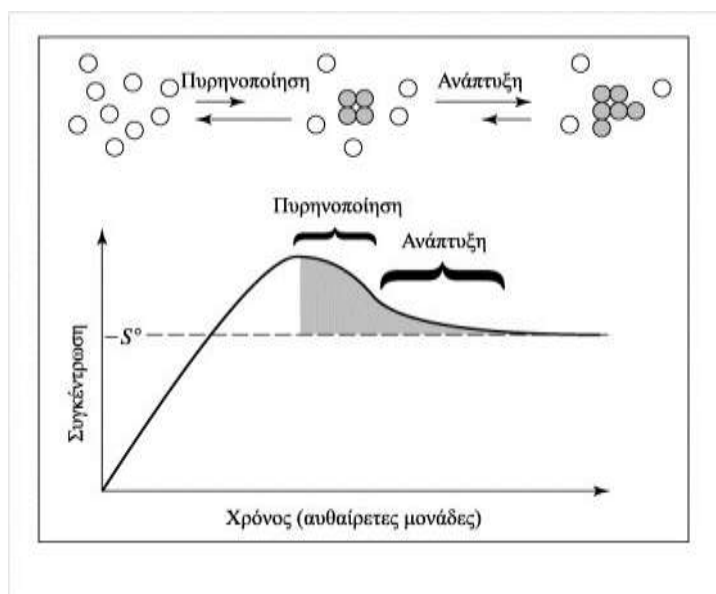
4.2 Φυσικοχημεία κρυστάλλωσης

Για να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση δεν αρκεί μόνο να ευνοείται θερμοδυναμικά αλλά απαραίτητη προϋπόθεση είναι και να μπορεί να ξεπεραστεί το ενεργειακό φράγμα. Η ενέργεια που απαιτείται για να δημιουργηθεί αυτή η ενεργειακά αναβαθμισμένη μεταβατική κατάσταση, μέσω της οποίας οδηγούμαστε στα προϊόντα, καλείται ενέργεια ενεργοποίησης και είναι αυτή που καθορίζει την κινητική της χημικής αντίδρασης [Φίλιππόπουλος & Γρηγοροπούλου, 1998].

Για να δημιουργήσουμε έναν κρύσταλλο, πρέπει κάπως να οδηγήσουμε τα διαλυμένα μόρια εκτός διαλύματος ή να τα κατακρημνίσουμε με έναν ελεγχόμενο τρόπο που να ευνοεί την τάξη τους.

Ένα μόριο εγκαταλείπει το διάλυμα, όταν η συγκέντρωση του υπερβεί την εγγενή του διαλυτότητα S^0 (η S^0 δεν είναι πραγματικά μια εγγενής ιδιότητα, αλλά εξαρτάται από εξωγενείς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας, της πίεσης και του διαλύτη). Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου απαιτεί την αύξηση της συγκέντρωσης του υλικού που είναι στην υπέρκορη κατάσταση (Εικόνα 16). Ακόμη η ανάγκη για υπέρκορο διάλυμα θα γίνει εμφανής, όταν αργότερα ασχοληθούμε με τον μηχανισμό της αύξησης του κρυστάλλου. Επίσης, η συγκέντρωση του μορίου μπορεί να αυξηθεί με την αφαίρεση μέρους του διαλύτη, προκειμένου να μειωθεί ο συνολικός όγκος του διαλύματος. Ακόμη, για τις μικρές οργανικές και ανόργανες ενώσεις, οι κρύσταλλοι μπορούν να αναπτυχθούν απλά εξατμίζοντας τον διαλύτη από το διάλυμα.

Μια δεύτερη στρατηγική για την κατακρήμνιση ενός μορίου είναι να μειωθεί η εγγενής του διαλυτότητα S^0 για μια σταθερή συγκέντρωση του υλικού. Εναλλακτικά, μπορούμε να επιδράσουμε στην εγγενή διαλυτότητα S^0 με την τροποποίηση του διαλύτη (όπως με την αύξηση ή τη μείωση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος). Η βέλτιστη διαλυτότητα πολύ-ηλεκτρολυτών, όπως πολυπεπτίδια ή πολυνουκλεοτίδια, εμπίπτει σε μια συγκεκριμένη περιοχή των συγκεντρώσεων αλάτων. Εάν η ιοντική του διαλύματος αυξηθεί πέραν αυτής της περιοχής με την προσθήκη άλατος ή με εξάτμιση, ή μειωθεί κάτω από αυτήν με διαπίδυση, η εγγενής διαλυτότητα θα μειωθεί και το μόριο θα κατακρημνισθεί. Αυτές είναι οι τυπικές διαδικασίες εναλάτωσης (salting in) και εξαλάτωσης (salting out) που χρησιμοποιούνται σε πολλές τεχνικές καθαρισμού μορίων [Kensal E. van Holde].



Εικόνα 16. Μηχανισμός της κρυστάλλωσης. Το αρχικό βήμα στην κρυστάλλωση είναι ο σχηματισμός πυρήνων ενός ελάχιστου κρυσταλλικού πλέγματος. Αυτό είναι ένα μικρής πιθανότητας βήμα που εμφανίζεται σε ένα υπέρκορο διάλυμα. Ο κρύσταλλος αναπτύσσεται με την προσθήκη μορίων στην επιφάνεια του πυρήνα. Αυτό συμβαίνει σε συγκεντρώσεις κοντά στην διαλυτότητα S° του μορίου [Kensal E. van Holde].

4.3 Συνθήκες για κρυστάλλωση μακρομορίων

Υπάρχουν διάφοροι σημαντικοί παράγοντες, που επηρεάζουν την κρυστάλλωση ενός μορίου. Ίσως ο σημαντικότερος είναι η καθαρότητα του δείγματος, όπου μπορεί να διακριθεί η καθαρότητα από βιοχημική και δομική άποψη. Ένα δείγμα θεωρείται ως *βιοχημικά καθαρό*, όταν κάθε μακομόριο στο δείγμα έχει τον ίδιο μοριακό τύπο. Αυτή είναι σαφώς η ιδανική κατάσταση και γενικά δεν επιτυγχάνεται. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ένα μακρομόριο πρέπει να είναι περισσότερο από 95% καθαρό για να παράγει ένα κρύσταλλο.

Η *δομική καθαρότητα* αναφέρεται στη διαμόρφωση των μορίων σε ένα συγκεκριμένο δείγμα. Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των διαφόρων διαμορφώσεων ενός μακρομορίου μπορεί να είναι πολύ μικρή. Ακόμη και ένα χημικά καθαρό δείγμα μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν ιδιαίτερα ετερογενή πληθυσμό διαμορφώσεων. Κατά συνέπεια, τα διαλύματα και οι μέθοδοι κρυστάλλωσης επιλέγονται έτσι, ώστε να ευνοήσουν τη φυσική διαμόρφωση του μακρομορίου.

Διαπιστώνεται ακόμη, ότι η κρυστάλλωση ενός μακρομορίου απαιτεί την εύρεση συνθηκών που ισορροπούν τη διαλυτότητα με τη δομική ομοιογένεια. Αυτές είναι πιθανό να αποτελούν ένα μικρό υποσύνολο των συνθηκών που ικανοποιούν κάθε ένα κριτήριο μεμονωμένα. Κατά συνέπεια, μπορεί να παραμείνει δύσκολος ο προσδιορισμός των συγκεκριμένων συνθηκών κρυστάλλωσης, ακόμη και αν είναι γνωστές οι συνθήκες υπό τις οποίες το μακρομόριο είναι αδιάλυτο. Για αυτόν τον λόγο, η εύρεση των συνθηκών κρυστάλλωσης είναι ουσιαστικά μια μέθοδος εμπειρικών δοκιμών. Δηλαδή, το μόριο τοποθετείται σε έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών συνθηκών διαλύματος, με την ελπίδα, ότι θα βρεθούν κάποιες συνθήκες, που να ικανοποιούν τόσο τις απαιτήσεις για τη διαλυτότητα όσο και για τη διαμόρφωση, και οι οποίες θα ευνοούν την ανάπτυξη του κρυστάλλου.

Σήμερα, υπάρχει ένας όλο και αυξανόμενος αριθμός μακρομορίων (πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων), που έχουν κρυσταλλωθεί από μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών διαλυμάτων. Εντούτοις, οι κρύσταλλοι σχεδόν όλων των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων μπορούν να αναπτυχθούν από ένα μικρό υποσύνολο αυτών των συνθηκών. Υπάρχουν τουλάχιστον 50 διαφορετικοί διαλύτες και διαλύματα αλάτων, που χρησιμοποιούνται ευρέως ως αφετηρίες για την αναζήτηση των συνθηκών κρυστάλλωσης μακρομορίων. Μια περισσότερο επιστημονική προσέγγιση στην κρυστάλλωση των μακρομορίων είναι ακόμα επιθυμητή.

Για να κατανοηθούν οι τεχνικές κρυστάλλωσης μακρομορίων, πρέπει να συγκριθούν οι μηχανισμοί ανάπτυξης κρυστάλλων με εκείνους της άμορφης κατακρήμνισης. Η υψηλή τάξη των μορίων σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα μειώνει σημαντικά την εντροπία σε σχέση με το διάλυμα. Οι εξωτερικοί βαθμοί περιστροφικής και μεταφορικής ελευθερίας (κίνηση ολόκληρου μορίου) σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα είναι κατά πολύ λιγότεροι από εκείνους στο διάλυμα. Για παράδειγμα δύο μόρια στο διάλυμα έχουν το καθένα πλήρη μεταφορική και περιστροφική ελευθερία σε τρεις διαστάσεις. Εάν τα δύο μόρια συναθροισθούν, ώστε να *σχηματίσουν τον πυρήνα* ενός κρυσταλλικού πλέγματος οι μετατοπίσεις τους γίνονται απόλυτα συσχετισμένες και οι εξωτερικοί βαθμοί ελευθερίας γίνονται 9 φορές λιγότεροι.

Σ' ένα επόμενο στάδιο, η αύξηση του κρυστάλλου θεωρείται ως προθήκη μορίων στις ήδη υπάρχουσες επιφάνειες του κρυσταλλικού πλέγματος πυρηνοποίησης. Η απώλεια στην εντροπία σε αυτά τα επόμενα βήματα αναμένεται να είναι μικρότερη απ' ότι για

το βήμα σχηματισμού του πυρήνα. Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου, επομένως, συμβαίνει σε δύο διακριτικά βήματα:

(1) ένα βήμα χαμηλής πιθανότητας για την πυρηνοποίηση και

(2) ένα βήμα υψηλής πιθανότητας για την αύξηση (ή διάδοση) του μεγέθους του κρυστάλλου. Τα δύο βήματα στην ανάπτυξη κρυστάλλου είναι ανάλογα με τα βήματα στο μοντέλο φερμουάρ για τις δομικές μετατοπίσεις στα μακρομόρια.

Επιπλέον παρατηρείται, ότι το στάδιο πυρηνοποίησης απαιτεί μια πολύ μεγάλη οδηγό δύναμη. Η απαραίτητη οδηγός δύναμη για την πυρηνοποίηση προέρχεται από την αύξηση της συγκέντρωσης των μακρομορίων σε τιμή αρκετά υψηλότερη από την εγγενή διαλυτότητά τους (υπερκορεσμένη). Η επακόλουθη προσθήκη μορίων στις κρυσταλλικές επιφάνειες λαμβάνει χώρα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τον υπερκορεσμό, κοντά στην εγγενή διαλυτότητα. Κατά συνέπεια, η αύξηση είναι μια σειρά βημάτων μικροϊσορροπίας για τα μακρομόρια του διαλύματος που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια του κρυσταλλικού πλέγματος.

Η πυρηνοποίηση που αναφέρθηκε παραπάνω είναι το σημαντικότερο από τα δύο βήματα. Εάν το διάλυμα δεν προσεγγίσει τον υπερκορεσμό, ο πυρήνας δεν σχηματίζεται και ο κρύσταλλος δεν μπορεί να δημιουργηθεί. Από την άλλη, ένα υπέρκορο διάλυμα θα σχηματίσει πολύ γρήγορα πολλαπλούς πυρήνες, που θα εξαντλήσουν τα μόρια από το διάλυμα κρυστάλλωσης. Αυτό οδηγεί σε μία πληθώρα μικροσκοπικών κρυστάλλων. Πρέπει να υπάρξει μια ισορροπία μεταξύ των δύο ακραίων καταστάσεων, προκειμένου να αναπτυχθούν αρκούντως μεγάλοι μονοκρύσταλλοι, οι οποίοι να παράσχουν υψηλής ευκρίνειας, δεδομένα περίθλασης ακτίνων-X. Κατά συνέπεια, το διάλυμα των μακρομορίων πρέπει να συμπυκνωθεί με έναν πολύ καλό ελεγχόμενο τρόπο [Kensal E. van Holde].

4.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών

Φυσικοί παράγοντες	Χημικοί παράγοντες	Βιοχημικοί παράγοντες
Θερμοκρασία/διακυμάνσεις θερμοκρασίας	pH	Καθαρότητα
Μεθοδολογία/τρόπος προσέγγισης της ισορροπίας	Είδος παράγοντα καθίζησης	Επίδραση προσδέτη
Βαρύτητα	Συγκέντρωση παράγοντα καθίζησης	Στάδιο σχηματισμού συσσωματωμάτων
Πίεση	Ιοντική ισχύς	Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις
Χρόνος	Ειδικά ιόντα	Πηγή
Δονήσεις / ήχος / μηχανική διαταραχή	Βαθμός υπερκορεσμού	Πρωτεόλυση /υδρόλυση
Ηλεκτρικό/ μαγνητικό πεδίο	Αναγωγικό/οξειδωτικό περιβάλλον	Χημική τροποποίηση
Διηλεκτρικές ιδιότητες του μέσου	Συγκέντρωση πρωτεΐνης	Γενετικές τροποποιήσεις
Ιξώδες (viscosity)	Μεταλλικά ιόντα	Συμμετρία
Κατάσταση ισορροπίας	Σταυροδεσμοί	Σταθερότητα
Ομοιογένεια/ετερογένεια πυρήνων κρυστάλλωσης	Απορρυπαντικά/επιφανειο-δραστικές ουσίες/αμφολύτες	Ισοηλεκτρικό σημείο
	Προσμίξεις	Ιστορικό δείγματος

Πίνακας 2: Παρουσίαση φυσικών, χημικών και βιολογικών παραγόντων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση πρωτεϊνών [McPherson, 1997].

Η μέθοδος που εφαρμόζεται (όπως προαναφέρθηκε) συνήθως είναι αυτή της δοκιμής-σφάλματος (trial-error method), δοκιμάζοντας τις μέχρι τώρα γνωστές συνθήκες

κρυστάλλωσης. Σήμερα έχουν επίσης αναπτυχθεί συστήματα ρομποτικής για τη γρηγορότερη ανάλυση, τη βελτιστοποίηση των συνθηκών αλλά και την ελαχιστοποίηση της ποσότητας της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται.

Θερμοκρασία. Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αταξίας των διαλυμένων μορίων, με αποτέλεσμα να είναι επιτρεπτές μακρομοριακές διευθετήσεις υψηλότερης ελεύθερης ενέργειας, εφόσον οι παράμετροι της εντροπίας τείνουν να επικρατήσουν αυτών της ενθαλπίας. Επιπλέον η διηλεκτρική σταθερά μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας [McMurry, 2001].

pH. Αλλαγές στο pH επηρεάζουν τόσο το διαλύτη, όσο και τη διαλυμένη ουσία. Το pH εκείνο στο οποίο η πρωτεΐνη δεν παρουσιάζει φορτίο ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο και η διαλυτότητάς της σ' αυτό είναι η ελάχιστη δυνατή. Παράλληλα σε αυτό το σημείο η πρωτεΐνη διογκώνεται και η ποσότητα του δεσμευμένου νερού ελαχιστοποιείται. Η ρύθμιση του pH γίνεται με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων [McMurry, 2001].

Άλατα. Τα άλατα μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους κάποιοι από τους οποίους είναι οι εξής:

1. Είναι υπεύθυνα για την ιοντική ισχύ και επηρεάζουν τις μακρομοριακές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η άπωση μεταξύ ηλεκτρολυτών του ίδιου φορτίου μειώνεται.
2. Μπορούν να σχηματίσουν απ' ευθείας αλληλεπιδράσεις με φορτισμένα αμινοξέα (αργινίνη, λυσίνη, ασπαρτικό, γλουταμικό) στην επιφάνεια των πρωτεϊνών.
3. Δρουν με διπολικές – μονοπολικές αλληλεπιδράσεις με τις διπολικές ομάδες των μακρομορίων (πεπτιδικοί δεσμοί, αμινο-, υδροξυ-, καρβοξυλικές ομάδες και αμίδια) και μπορούν να οδηγήσουν σε μερική αποδιάταξη της πρωτεΐνης.
4. Σχηματίζουν μη πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδρόφοβων αμινοξέων εκτεθειμένων στο διαλύτη και των υδρόφοβων τμημάτων των οργανικών αλάτων (σουλφονικών, καρβοξυλικών, αμμωνιακών) [McMurry, 2001].

Ανταγωνιστές δεσμών υδρογόνου. Μόρια όπως η ουρία, το φορμαμίδιο και τα γουανιδινικά άλατα, σε υψηλές συγκεντρώσεις ($C \geq 4 \text{ M}$) ανταγωνίζονται τους

δεσμούς υδρογόνου των μορίων του νερού και τους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου της πρωτεΐνης, δρώντας σαν αποδιατακτικοί παράγοντες, ενώ στην αντίθετη περίπτωση σταθεροποιούν τους υδροφοβικούς δεσμούς [McMurry, 2001].

Οργανικοί διαλύτες. Τροποποιούν τη διηλεκτρική σταθερά προκαλώντας αλλαγές σε διάφορες αλληλεπιδράσεις. Με μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς παρουσιάζεται αύξηση της ηλεκτροστατικής έλξης μεταξύ ανόμοιων φορτίων, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται η διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτεί το γεγονός ότι οι οργανικοί διαλύτες ορισμένες φορές μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες και οδηγούν σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα [McMurry, 2001].

4.5 Διαλύτης συγκρυστάλλωσης

Η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ των πρωτεϊνικών κρυστάλλων και των κρυστάλλων που σχηματίζουν τα μικρότερα-μόρια είναι ότι οι κρύσταλλοι πρωτεΐνης περιέχουν σημαντική ποσότητα υγρού διαλύτη. Οι κρύσταλλοι γενικά αποτελούνται από δυο φάσεις: μια στερεή, που αποτελείται από τα σημεία επαφής των μακρομορίων και δημιουργεί το ανοιχτό πλέγμα και μια υγρή, που συμπληρώνει τα κενά μεταξύ του πλέγματος. Τα μόρια του διαλύτη που βρίσκονται πιο κοντά στα πρωτεϊνικά μακρομόρια, είναι σαφώς οργανωμένα και συνδέονται με τις επιφανειακές πολικές ομάδες της πρωτεΐνης με ισχυρές αλληλεπιδράσεις, ενώ εκείνα που εισχωρούν στα κανάλια που σχηματίζει η πρωτεΐνη είναι αποδιοργανωμένα [Blundell & Johnson, 1976].

4.6 Κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης

4.6.1 Γενικά

Η κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης είναι μια ταχεία μέθοδος αναγνώρισης νέων εν δυνάμει φαρμάκων και οι μέθοδοι υψηλής απόδοσης που έχουν αναπτυχθεί για την κρυσταλλογραφία ακτίνων-X είναι πολύ εξελιγμένοι [Blundell *et al.*, 2002].

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πάρα πολλές βελτιώσεις τόσο στο μηχανολογικό κομμάτι όσο και στο λογισμικό των ηλεκτρονικών υπολογιστών με αποτέλεσμα η συλλογή δεδομένων να έχει γίνει ταχύτερη και αποτελεσματικότερη. Η επεξεργασία και η ανάλυση των δεδομένων εξακολουθούν να είναι δύο από τα βασικότερα στάδια,

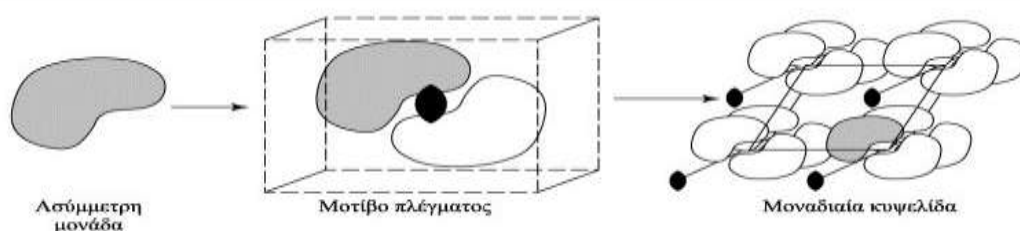
κυρίως γιατί το πλήθος των ενώσεων που μελετούνται είναι εξαιρετικά μεγάλο και η επανάληψη των μετρήσεων για την επικύρωση των αποτελεσμάτων είναι επιβεβλημένη. Ωστόσο η χρήση εξειδικευμένων προγραμμάτων ελαχιστοποιεί την ανθρώπινη παρέμβαση και άρα αποκλείει το ανθρώπινο λάθος [Blundell *et al.*, 2002]. Με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας υψηλής απόδοσης μελετάται ο τρόπος σύνδεσης και οι βασικές αλληλεπιδράσεις των ενώσεων, οι οποίες αν και εμφανίζουν μικρή συγγένεια με το μακρομοριακό στόχο, συνδέονται σ' αυτό με μεγάλη εξειδίκευση. Η έκφραση, ο καθαρισμός και ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών σε ποσότητα και μορφή που απαιτείται για την κρυστάλλωση και την ανάλυση ακτίνων-X είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απασχολεί το μεγαλύτερο ποσοστό των ερευνητών. Ο αρχικός στόχος είναι η λήψη μιας μικρής ποσότητας πρωτεΐνης, η οποία θα δώσει κάποιους καλούς κρυστάλλους. Ο αντικειμενικός στόχος είναι η ανακάλυψη περιοχών οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να αναδιπλώνονται και να διαλυτοποιούνται. Οι περιοχές αυτές θα πρέπει να μην έχουν αλληλουχίες μικρής πολυπλοκότητας, που μπορεί να έχουν περισσότερες από μία διαμορφώσεις και να παρεμβάλλουν στη κρυστάλλωση, αλλά ούτε και μεγάλους βρόχους, οι οποίοι καθιστούν την πρωτεΐνη μη λειτουργική και χωρίς συγκεκριμένη διαμόρφωση [Blundell *et al.*, 2002].

Ωστόσο ακόμη και σήμερα, η ανάπτυξη κρυστάλλων καλής ποιότητας, που να μπορούν να δώσουν περίθλαση σε υψηλή ευκρίνεια παραμένει ένα ουσιαστικό πρόβλημα. Κάποια πρωτεϊνικά μόρια δίνουν άριστους κρυστάλλους μόνο μετά από λίγες προσπάθειες ενώ άλλα απαιτούν μερικούς μήνες και για πολλά δεν έχει γίνει δυνατή η κρυστάλλωσή τους. Η βελτίωση της ποιότητας των κρυστάλλων συμβάλλει κατά πολύ στην ακριβέστερη ανάλυση της δομής σε υψηλότερη ευκρίνεια [Acharya & Rees, 1997].

4.6.2 Βασικές αρχές

Οποιοδήποτε συμμετρικό σύστημα μπορεί να αναχθεί σε ένα επίπεδο, στο οποίο δεν είναι πλέον συμμετρικό. Σε έναν κρύσταλλο, η μοριακή οντότητα του αντιστοιχεί στο επίπεδο χωρίς καμία συμμετρία, καλείται *ασύμμετρη μονάδα*. Αρχίζοντας από την ασύμμετρη μονάδα, μπορούμε τώρα να εφαρμόσουμε τελεστές περιστροφής και ελικώσεως (δηλαδή μετατόπισης και στροφής) για να κατασκευάσουμε το μοτίβο του κρυσταλλικού δικτυωτού πλέγματος [Kensal E. van Holde].

Το μοτίβο του κρυσταλλικού πλέγματος μετατοπίζεται και προς τις τρεις διαστάσεις, σχηματίζοντας μια κανονική και επαναλαμβανόμενη διάταξη, που αποκαλείται *κρυσταλλικό πλέγμα*. Κάθε επαναλαμβανόμενο μοτίβο καταλαμβάνει ένα σημείο μέσα στο κρυσταλλικό πλέγμα (Εικόνα 17). Τα γειτονικά σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους για να αποτελέσουν τις κορυφές τρισδιάστατων κουτιών, τα οποία είναι μοναδιαίες ή στοιχειώδεις κυψελίδες. Κάθε μοναδιαία κυψελίδα περιλαμβάνει όλα τα άτομα των μοτίβων του κρυσταλλικού πλέγματος και της ασύμμετρης μονάδας. Οι ακμές της μοναδιαίας κυψελίδας ορίζουν ένα σύνολο μοναδιαίων διανυσματικών αξόνων **a**, **b** και **c**, με τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας να απεικονίζονται στα αντίστοιχα μήκη τους *a*, *b* και *c*. Αυτά τα διανύσματα δεν χρειάζεται να είναι κάθετα μεταξύ τους, και οι γωνίες μεταξύ των αξόνων ορίζονται ως α μεταξύ των **b** και **c**, β μεταξύ των **a** και **c**, και γ μεταξύ των **a** και **b**. Η σχέση μεταξύ των μηκών *a*, *b* και *c* και των γωνιών α , β , και γ των μοναδιαίων κυψελίδων καθορίζει μοναδικά τη μορφή και το μέγεθος της μοναδιαίας κυψελίδας. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί για τη μορφή της μοναδιαίας κυψελίδας [Kensal E. van Holde].



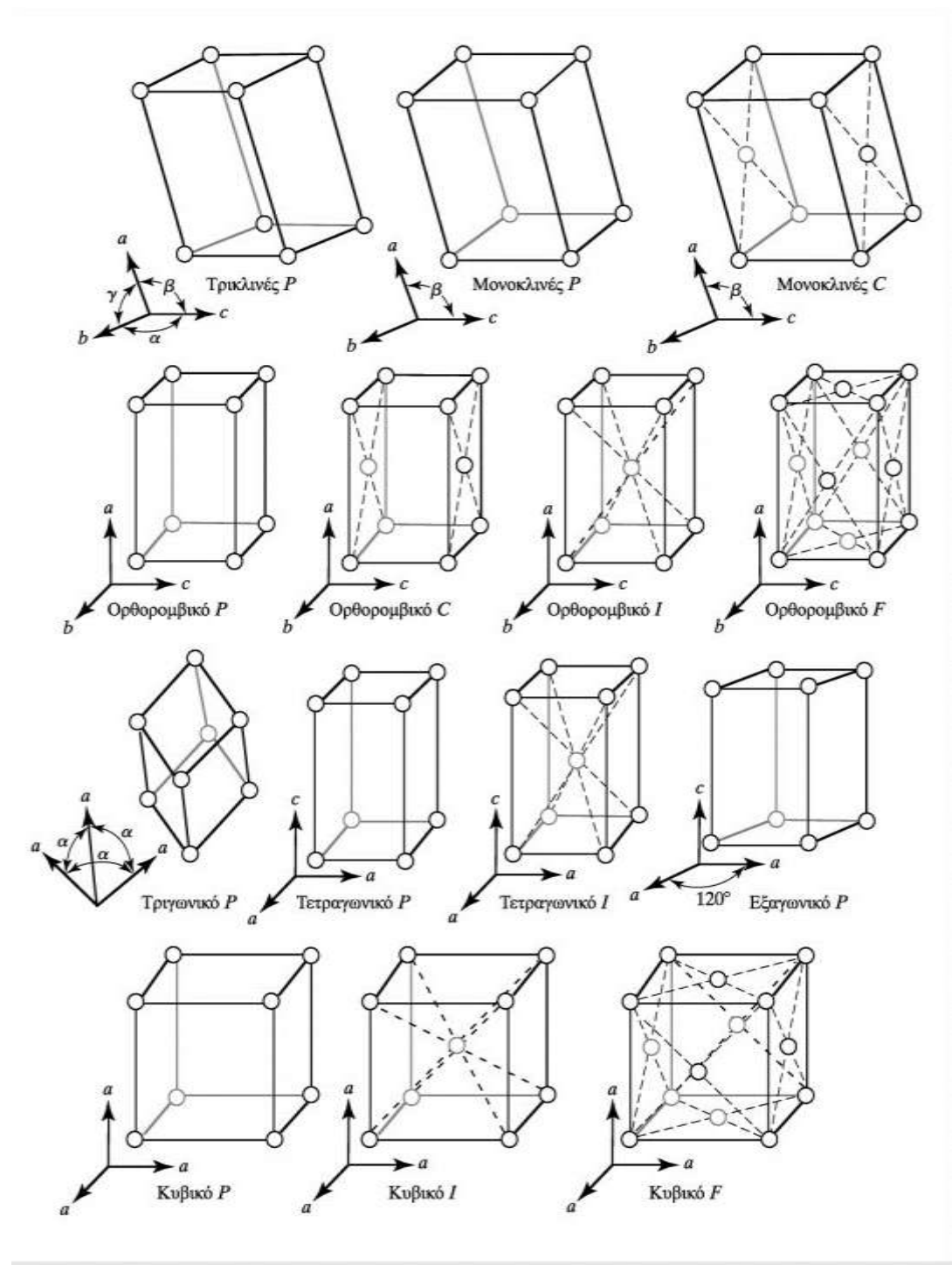
Εικόνα 17. Τα στοιχεία ενός κρυστάλλου. Η ασύμμετρη μονάδα είναι εκείνο το μέρος του κρυστάλλου που δεν εμφανίζει καμία συμμετρία. Ένας τελεστής συμμετρίας παράγει το μοτίβο του δικτυωτού πλέγματος. Η επανάληψη αυτού του μοτίβου από τη μετατόπιση παράγει τις κορυφές της μοναδιαίας κυψελίδας, η οποία είναι η βασική μονάδα επανάληψης του πλέγματος του κρυστάλλου [Kensal E. van Holde].

Ένας *κρύσταλλος* είναι μια επαναλαμβανόμενη σε τρεις διαστάσεις διάταξη (χωρίς κενά) των μοναδιαίων κυψελίδων, που οικοδομεί ένα κρυσταλλικό πλέγμα. Αυτό περιορίζει αυτόματα τη μορφή της μοναδιαίας κυψελίδας σε ένα παραλληλεπίπεδο, με τέσσερις ακμές ανά μία έδρα και έξι έδρες ανά μοναδιαία κυψελίδα. Ένας κρύσταλλος κατασκευάζεται με τη μετατόπιση του επαναλαμβανόμενου μοτίβου (τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος), και το μοτίβο του κρυσταλλικού πλέγματος

παράγεται με τη μορφή των τελεστών συμμετρίας στην ασύμμετρη μονάδα [Kensal E. van Holde].

Επειδή, όλες οι μοναδιαίες κυψελίδες μέσα σε ένα κρύσταλλο είναι ίδιες, η *μορφολογία* ενός κρυστάλλου καθορίζεται από το μέγεθος και τη μορφή μιας μοναδιαίας κυψελίδας (τα μήκη του a , του b , και του c και των γωνιών α , β , και γ) καθώς και από τη συμμετρία του μοτίβου. Κάθε επίπεδο του κρυστάλλου, με εξαίρεση την ασύμμετρη μονάδα, μπορεί να παραχθεί χρησιμοποιώντας μαθηματικούς τελεστές. Η επίλυση μιας κρυσταλλικής δομής απαιτεί μόνο τον προσδιορισμό των θέσεων των ατόμων στην ασύμμετρη μονάδα [Kensal E. van Holde].

Οι περιορισμοί που τίθενται για τη μορφή της μοναδιαίας κυψελίδας επιτρέπουν την κατασκευή 14 μοναδικών κρυσταλλικών πλεγμάτων. Αυτά είναι τα *κρυσταλλικά πλέγματα Bravais* (Εικόνα 18). Ο ανασυνδυασμός των 32 τύπων συμμετρίας μαζί με τα 14 κρυσταλλικά πλέγματα Bravais περιγράφουν όλες τις πιθανές μορφολογίες των κρυστάλλων που παράγουν τις μορφές και τη συμμετρία 230 διαφορετικών *ομάδων χώρου*. Η ομάδα χώρου που αποδίδεται σε ένα κρύσταλλο, καθορίζει μοναδικά τον αριθμό των ασύμμετρων μονάδων, που συναποτελούν τη μοναδιαία κυψελίδα του κρυστάλλου. Κάθε ομάδα χώρου καθορίζει τον τύπο του κρυσταλλικού πλέγματος και τη συμμετρία της μοναδιαίας κυψελίδας [Kensal E. van Holde].



Εικόνα 18. Τα 14 δικτυωτά πλέγματα Bravais στην κρυσταλλογραφία [Kensal E. van Holde].

Όλοι οι τελεστές συμμετρίας που περιγράφονται από τις διάφορες ομάδες σημείου, μπορούν, εν δυνάμει, να ενσωματωθούν σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα. Εντούτοις, υπάρχουν περιορισμοί που επιβάλλονται από τον ορισμό μιας μοναδιαίας κυψελίδας και από την ασυμμετρία των περισσότερων βιολογικών πολυμερών. Οι τελεστές συμμετρίας που αναστρέφουν τη στερεοδιάταξη ενός χειρόμορφου κέντρου δεν

επιτρέπονται στους κρυστάλλους των βιολογικών μακρομορίων. Η κατοπτρική συμμετρία, που αφορά τα L- και D- στερεϊσομερή, δεν απαντάται στους κρυστάλλους των βιολογικών μακρομορίων. Κατά συνέπεια, οι δύο επιτρεπτοί τύποι τελεστών συμμετρίας που παρατηρούνται στους κρυστάλλους των βιολογικών μορίων, είναι οι τελεστές περιστροφής και ελικώσεως (περιστροφικής μετατόπισης). Αυτό μειώνει τις 230 πιθανές ομάδες χώρου, που συνδέονται με τα βιολογικά μακρομόρια που υπάρχουν στη φύση, σε μόνο 65 [Kensal E. van Holde].

Τα περιστροφικά στοιχεία της συμμετρίας κρυστάλλου περιορίζονται από τις γωνίες α , β , και γ . Αφού η συμμετρία C_2 (φερόμενη απλά και ως 2 για στροφή $2^{ας}$ τάξεως) και 2_1 συσχετίζουν δύο αντικείμενα περιστρέφοντας κατά 180° , αυτά τα στοιχεία συμμετρίας απαιτούν τουλάχιστον σύνολα ορθογωνίων εδρών σε μία μοναδιαία κυψελίδα. Η περιστροφική συμμετρία $4^{ης}$ τάξεως (ή τετραπλή) απαιτεί, τουλάχιστον ένα σύνολο εδρών, να είναι επίσης τετράγωνα. Παρατηρούμε, ότι η στροφή $5^{ης}$ τάξεως (ή πενταπλή) δεν επιτρέπεται στην καθιερωμένη κρυσταλλογραφία. Ο άξονας στροφής ή ελίκωσης $5^{ης}$ τάξεως καθορίζει μία πενταγωνική έδρα. Δεδομένου, ότι τα κανονικά πεντάγωνα δεν μπορούν να πακεταριστούν στον τρισδιάστατο χώρο χωρίς ενδιάμεσα χάσματα, δεν μπορούμε να καθορίσουμε μία μοναδιαία κυψελίδα με μία έδρα που να έχει πέντε ακμές (αυτός ο κανόνας έχει πρόσφατα αμφισβητηθεί, αλλά μέχρι τώρα η διαμάχη δεν έχει επιλυθεί). Οι τριπλές στροφές ($3^{ης}$ τάξεως) απαιτούν τα μήκη των πλευρών να είναι ίδια, όπως και οι γωνίες των μοναδιαίων κυψελίδων. Αυτό μπορεί να διευθετηθεί με την τοποθέτηση του τριπλού άξονα στην κορυφή της μοναδιαίας κυψελίδας ή έχοντας δύο παρακείμενους τριπλούς άξονες σε μία έδρα. Μια συμμετρία στροφής ή ελικώσεως $6^{ης}$ τάξεως εμφανίζεται σε μια εξαγωνική έδρα και συσχετίζει στρέφοντας κατά 60° δύο ακμές της μοναδιαίας κυψελίδας. Αυτές οι στροφές και οι σχετικοί τελεστές ελικώσεως αποτελούν την επέκταση των τύπων συμμετρίας που είναι δυνατοί για τη μοναδιαία κυψελίδα μακρομοριακών κρυστάλλων. Επιπλέον, η παρουσία δύο ορθογώνιων μεταξύ των αξόνων συμμετρίας καθορίζει αυτόματα και ένα τρίτο ορθογώνιο άξονα συμμετρίας. Οι άξονες συμμετρίας σε μία μοναδιαία κυψελίδα δεν είναι υποχρεωτικό να τέμνονται στο κέντρο. Εάν όμως δύο άξονες τέμνονται στο κέντρο, ο τρίτος άξονας πρέπει επίσης να τέμνεται. Αντιστρόφως, εάν δύο άξονες δεν τέμνονται, τότε και ο τρίτος άξονας πρέπει να μην τέμνεται [Kensal E. van Holde].

Παρότι τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος καταλαμβάνουν απαραίτητως τις κορυφές της μοναδιαίας κυψελίδας, δεν περιορίζονται μόνο σε αυτές. Πρόσθετα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος μπορούν να βρεθούν στο κέντρο των εδρών ή στο κέντρο της μοναδιαίας κυψελίδας. Εάν τα σημεία κρυσταλλικού πλέγματος βρίσκονται μόνο στις κορυφές, η μοναδιαία κυψελίδα είναι απλή (primitive) και το κρυσταλλικό πλέγμα συμβολίζεται με το P. Εάν σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος βρίσκονται στα κέντρα και των έξι εδρών, τότε έχουμε ένα ολοεδρικό κεντρωμένο (face-centered) ή κρυσταλλικό πλέγμα F. Τέλος, μία μοναδιαία κυψελίδα που περιέχει ένα σημείο του κρυσταλλικού πλέγματος στο κέντρο μάζας της, είναι η **ενδοκεντρωμένη** (body-centered) και ορίζεται ως κρυσταλλικό πλέγμα I. Υπάρχει μια αντιστοιχία μεταξύ της τοποθέτησης των σημείων κρυσταλλικού πλέγματος και των αξόνων συμμετρίας [Kensal E. van Holde].

Ο τύπος του κρυσταλλικού πλέγματος μαζί με τη συμμετρία της μοναδιαίας κυψελίδας καθορίζουν την *ομάδα συμμετρίας χώρου* (space group) του κρυστάλλου. Τα σύμβολα για τις ομάδες χώρου συμπεριλαμβάνουν στη μορφή $LR_T R_T R_T$ στον τύπο του κρυσταλλικού πλέγματος (L) αφενός και τη συμμετρία της μοναδιαίας κυψελίδας αφετέρου (R_T , όπου το R είναι η στροφή και το T αποδίδει το στοιχείο μετατόπισης του τελεστή συμμετρίας) [Kensal E. van Holde].

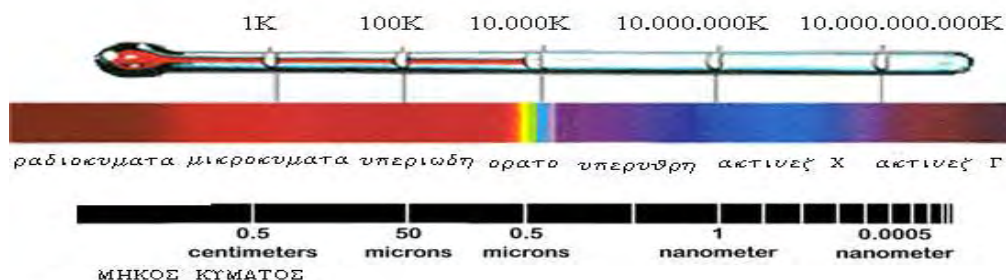
Επίσης, στη συνέχεια θα αναφερθούμε στην ανάλυση πλεγμάτων Bravais με τη μοναδιαία κυψελίδα που έχει τη χαμηλότερη δυνατή συμμετρία. Αυτό είναι το τρικλινές κρυσταλλικό πλέγμα, όπου $a \neq b \neq c$ και $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$ ή 120° . Όλες οι ακμές της κυψελίδας έχουν διαφορετικά μήκη και όλες οι έδρες είναι επικλινείς. Δεδομένου, ότι καμία από τις έδρες δεν είναι ορθογώνια ή εξαγωνική, δεν μπορεί να υπάρξει κανένας άξονας συμμετρίας μέσω οποιωνδήποτε εδρών. Ομοίως, το κρυσταλλικό πλέγμα μπορεί να είναι μόνο απλό. Κατά συνέπεια, μία τρικλινής μοναδιαία κυψελίδα συνδέεται αυτόματα με την ομάδα χώρου $P1$. Εάν μια γωνία έχει την τιμή 90° , τότε και μία δεύτερη γωνία επίσης να είναι 90° , διαμορφώνοντας μια μονοκλινή κυψελίδα. Αυτό απαιτεί μια ομάδα χώρου με άξονα στροφής (ή ελικώσεως) $2^{\text{ας}}$ τάξεως. Παρατηρήθηκε, ότι ακόμα κι αν υπάρχουν δύο ορθογώνιες έδρες, μπορεί να υπάρξει ένας άξονας συμμετρίας. Η εισαγωγή ενός δευτέρου άξονα συμμετρίας, αυτόματα απαιτεί τον καθορισμό ενός τρίτου άξονα συμμετρίας, για τον οποίο απαιτείται και μία τρίτη ορθογώνια έδρα. Αυτό δεν επιτρέπεται σε μια μονόκλινη ομάδα χώρου. Κατά συνέπεια, μια μονοκλινής μοναδιαία κυψελίδα μπορεί να είναι είτε $P2$ είτε $P2_1$.

Τελικά, ένα πρόσθετο σημείο κρυσταλλικού πλέγματος μπορεί να προστεθεί στη μη ορθογώνια έδρα της μονοκλινούς μοναδιαίας κυψελίδας, δημιουργώντας το C κρυσταλλικό πλέγμα. Πάλι, για ένα κρυσταλλικό πλέγμα I ή F απαιτείται και οι τρεις μοναδικές έδρες να είναι ορθογώνιες, κάτι που είναι αντίθετο με τον ορισμό της μονοκλινούς μοναδιαίας κυψελίδας. Αυτοί οι περιορισμοί στη συμμετρία και στην τοποθέτηση των σημείων πλέγματος στη μοναδιαία κυψελίδα καθορίζουν τα 14 κρυσταλλικά πλέγματα Bravais και τις σχετικές ομάδες χώρου [Kensal E. van Holde].

Ακόμη, ο τύπος του κρυσταλλικού πλέγματος μαζί με τη συμμετρία της μοναδιαίας κυψελίδας καθορίζουν την ομάδα συμμετρίας χώρου της μοναδιαίας κυψελίδας. Τα μήκη και οι γωνίες της μοναδιαίας κυψελίδας καθορίζουν τις παραμέτρους της μοναδιαίας κυψελίδας, και η ομάδα χώρου μαζί με τις παραμέτρους της μοναδιαίας καθορίζουν τη μορφολογία του κρυστάλλου. Στη συνέχεια θα αναφερθεί, ότι είναι αυτή που υπαγορεύει τα γενικά χαρακτηριστικά του περιθλασιγράμματος των ακτίνων-X. Οι διαφορετικοί κρύσταλλοι των οποίων οι μοναδιαίες κυψελίδες έχουν τα ίδια μήκη αξόνων και γωνίες και ανήκουν στην ίδια ομάδα χώρου ονομάζονται *ισόμορφοι*. Τα περιθλασιγράμματα ακτίνων-X των ισόμορφων κρυστάλλων πρέπει επίσης να είναι πολύ όμοια [Kensal E. van Holde].

Γίνεται αντιληπτό, ότι όλα τα μόρια μέσα στον κρύσταλλο παράγονται με την εφαρμογή των τελεστών συμμετρίας σε μια ασύμμετρη μονάδα. Κατά συνέπεια, ένας κρύσταλλος δεν είναι τίποτα περισσότερο από μια ασύμμετρη μονάδα, που αντιγράφεται μαθηματικά στον τρισδιάστατο χώρο. Ή αλλιώς, όλες οι μοριακές ιδιότητες ενός κρυστάλλου μπορεί να αποδοθεί σε εκείνες της ασύμμετρης μονάδας. Εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων μπορεί να βεβαιωθεί ότι όλα τα μόρια ή οι ομάδες μορίων που αποτελούν την ασύμμετρη μονάδα σε ένα κρύσταλλο κατάλληλο για μελέτη με περίθλαση ακτίνων-X έχουν ουσιαστικά την ίδια στερεοδιάταξη. Επομένως, για να επιλυθεί η δομή ενός κρυστάλλου, χρειάζεται να επιλυθεί η δομή μόνο της ασύμμετρης μονάδας [Kensal E. van Holde].

4.6.3 Ακτίνες X (Röntgen)



Εικόνα 19: Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Η περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που βρίσκεται μεταξύ υπεριώδους ακτινοβολίας και ακτινοβολίας γ ονομάζεται περιοχή ακτίνων-X. Ακτίνες-X, με μήκη κύματος μεταξύ 0.1-100 Å περίπου, παράγονται όταν τα ηλεκτρόνια μεγάλης ενέργειας επιβραδύνονται από ύλη και η ενέργειά τους μετατρέπεται σε ακτινοβολία. Το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας εξαρτάται από την ενέργεια των ηλεκτρονίων. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X χρησιμοποιεί ακτίνες-X μήκους κύματος της τάξης του 1 Å. Ακτίνες-X επίσης εκπέμπονται από ορισμένα ραδιενεργά ισότοπα. Τέτοιες πηγές, παρ' όλο που είναι χρήσιμες για διάφορες ρυθμίσεις, δεν χρησιμοποιούνται για περίθλαση ακτίνων-X [Σ. Χαμόδρακας,1993].

Για την παραγωγή ακτίνων-X, ηλεκτρόνια παράγονται από ηλεκτρική θέρμανση νήματος βολφραμίου, επιταχύνονται από ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται από διαφορά δυναμικού της τάξης μερικών δεκάδων kilovolts μεταξύ νήματος βολφραμίου (καθόδου) και στόχου (αντικαθόδου), και κατευθύνονται προς τον στόχο που τα επιβραδύνει γρήγορα με πολλαπλές συγκρούσεις. Αποτέλεσμα της επιβράδυνσης των ηλεκτρονίων είναι η δημιουργία, σύμφωνα με την κλασσική ηλεκτρομαγνητική θεωρία, ακτινοβολία συνεχούς ηλεκτρομαγνητικού φάσματος [Σ. Χαμόδρακας,1993].

Το ορικό (ελάχιστο) μήκος κύματος της «λευκής» αυτής ακτινοβολίας καθορίζεται από την τάση επιτάχυνσης V , και μπορεί να υπολογισθεί από τη σχέση

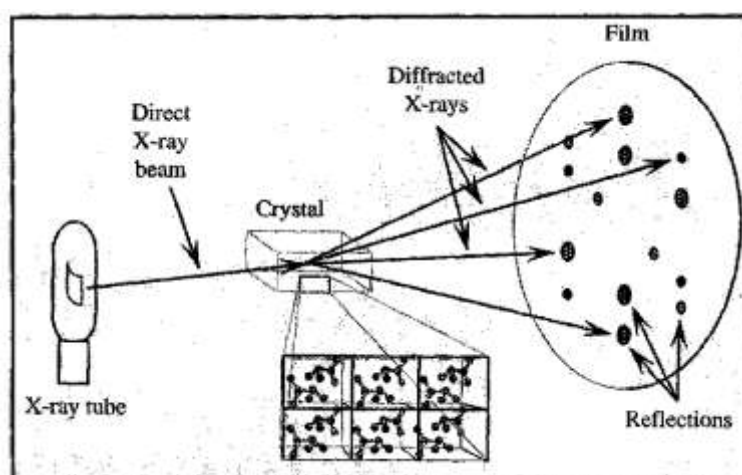
$$\lambda_{\min} = \frac{12398}{V} \text{ \AA}$$

Το μέγιστο της έντασης του συνεχούς φάσματος απαντά σε μεγαλύτερο μήκος κύματος. Καθώς η επιταχύνουσα διαφορά δυναμικού αυξάνεται, το ορικό μήκος κύματος και το μήκος κύματος στο οποίο παρατηρείται το μέγιστο της έντασης μετατοπίζονται σε μικρότερα μήκη κύματος, με σύγχρονη αύξηση της έντασης της ακτινοβολίας σε όλο το φάσμα. Ενώ η κατανομή της έντασης στο φάσμα της «λευκής» ακτινοβολίας εξαρτάται από τη φύση του υλικού της αντικαθόδου, τα φάσματα των ακτίνων-X δείχνουν επιπλέον μια σειρά διακριτών φασματικών γραμμών μεγάλης έντασης, των οποίων οι θέσεις μεταβάλλονται, μεταβαλλόμενης της φύσης του υλικού της αντικαθόδου. Οι κορυφές αυτές είναι «χαρακτηριστικές γραμμές» του υλικού της αντικαθόδου. Η δημιουργία των «χαρακτηριστικών γραμμών» εξηγείται ως εξής:

Όταν τα ηλεκτρόδια που βομβαρδίζουν την αντικάθοδο αποκτήσουν ορισμένες «κρίσιμες» ενέργειες, είναι ικανά να εκδιώξουν ηλεκτρόνια από τους εσωτερικούς ηλεκτρονικούς φλοιούς των υλικών της αντικαθόδου [Σ. Χαμόδρακας, 1993].

4.6.4 Πηγές ακτίνων-X και ανιχνευτές

Το πείραμα περίθλασης ακτίνων-X απαιτεί δύο κύρια όργανα, την πηγή και τον ανιχνευτή ακτίνων-X. Στην Εικόνα 19 παρουσιάζεται η διάταξη κατά το πείραμα της περίθλασης ακτίνων-X.



Εικόνα 20: Παρουσίαση της διάταξης κατά το πείραμα περίθλασης ακτίνων-X. Η πηγή ακτίνων-X εκπέμπει ακτίνες που προσπίπτουν στον κρύσταλλο (κρυσταλλικό πλέγμα), τα ηλεκτρόνια περιθλούν ακτινοβολία ίσου μήκους κύματος προς όλες τις κατευθύνσεις. Με τη βοήθεια του ανιχνευτή καταγράφεται το περιθλασίγραμμα, στο οποίο εντοπίζονται οι κηλίδες έντασης των περιθλάσεων.

Πηγές ακτίνων-X

Σήμερα υπάρχουν δύο κύρια είδη πηγών, οι συμβατικές πηγές που ελευθερώνουν ακτινοβολία μετά από επιτάχυνση ηλεκτρονίων (εντός ηλεκτρικού πεδίου) και μετάπτωση ηλεκτρονίων μετάλλου και οι συγχροτρονικές πηγές όπου επιταχυντές σωματιδίων (ηλεκτρονίων, ποζιτρονίων) προκαλούν σωματίδια να κινούνται σχεδόν με ταχύτητα του φωτός και να αποδίδουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατά την αλλαγή κατεύθυνσης.

Στις συμβατικές εργαστηριακές πηγές, οι ακτίνες X παράγονται από μια λυχνία με υψηλό κενό (περίπου 10^{-7} mmHg), η οποία περιέχει μια κάθοδο ηλεκτρικά θερμαινόμενη και μια άνοδο από κατάλληλο υλικό (συνήθως χαλκός, Cu, αλλά και μολυβδαίνιο, Mo. Μια πηγή υψηλής τάσης (20-70kV) συνδέει την άνοδο με την κάθοδο ενώ το θετικό δυναμικό της πηγής συνδέεται με την άνοδο. Η άνοδος ψύχεται διότι η υψηλή τάση θερμαίνει γρήγορα το μεταλλικό έλασμα. Ο συνηθέστερος τρόπος ψύξης της ανόδου είναι με τη χρησιμοποίηση νερού ενώ αποτελεσματική ψύξη πραγματοποιείται και με τη χρησιμοποίηση περιστρεφόμενης ανόδου, όπου το μέταλλο περιστρέφεται καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος για να αποφεύγεται η άνοδος της θερμοκρασίας σ' ένα μόνο σημείο [Τσαγκάρης, 1999].

Το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ της ανόδου και της καθόδου επιταχύνει τα ηλεκτρόνια, τα οποία αποκτούν ενέργειες της τάξης των 10^5 eV ($1\text{eV} = 1.6 \times 10^{-19}$ Joule) ικανές να παράγουν ακτίνες X στην άνοδο [Τσαγκάρης, 1999].

Οι πηγές συγχροτρονικής ακτινοβολίας αποτελούν μεγάλες εγκαταστάσεις με δακτυλίους επιτάχυνσης σωματιδίων από 10 έως μερικές εκατοντάδες μέτρα. Τα ηλεκτρόνια (ποζιτρόνια) διατηρούνται σε μία κυκλική τροχιά με τη βοήθεια ισχυρών μαγνητών. Υπάρχουν τέσσερις τύποι μαγνητικών πεδίων στους δακτυλίους αποθήκευσης σωματιδίων: οι μαγνήτες κλίσης, που αναγκάζουν τα σωματίδια να κινούνται σε κυκλική τροχιά και άλλες τρεις συσκευές, που επεκτείνουν και ενισχύουν το φάσμα σε μικρότερα μήκη κύματος χωρίς να προκαλούν καθαρή μετατόπιση από την κυκλική τροχιά π.χ. σύστημα μετατόπισης μήκους κύματος.

Το κύριο πλεονέκτημα της συγχροτρονικής ακτινοβολίας είναι η έντασή της που είναι περίπου δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από τις συμβατικές πηγές. Η ισχυρή ακτινοβολία χρησιμοποιείται για κρυσταλλικά δείγματα που περιθλούν ασθενώς, όπως μικροί κρύσταλλοι ή κρύσταλλοι με μεγάλη μοναδιαία κυψελίδα. Επίσης, λόγω της χαμηλής απόκλισης (divergence) της ακτίνας οι κηλίδες είναι πιο διακριτές.

Μία άλλη διαφορά της συγχροτρονικής ακτινοβολίας από τις συμβατικές πηγές είναι η δυνατότητα ρύθμισης του μήκους κύματος. Οποιοδήποτε μήκος κύματος από την περιοχή του υπέρυθρου μέχρι αυτή των ακτίνων-X μπορεί να επιλεγεί. Αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται σε πειράματα ανώμαλης σκέδασης από ακτίνες πολλαπλών μηκών κύματος. Συνήθως επιλέγονται ακτίνες X μήκους κύματος 1\AA ή ακόμα και μικρότερου μήκους κύματος με αποτέλεσμα τον περιορισμό της απορρόφησης κατά την πορεία της ακτίνας αλλά και εντός του κρυστάλλου, περιορίζοντας και την καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος του κρυστάλλου [Rhodes, 1993].

Η πρόσβαση στις συγχροτρονικές ακτίνες X είναι πολύ σημαντική. Το μήκος κύματος των ακτίνων-X είναι συγκρίσιμο με τις διατομικές αποστάσεις. Έτσι είναι δυνατή η περίθλαση ακτίνων-X από δείγματα κρυστάλλων και οι δομές τους μπορούν να αναλυθούν σε ατομική κλίμακα. Αυτό φυσικά έχει σαν αποτέλεσμα η συμβολή της συγχροτρονικής ακτινοβολίας στην πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία να είναι κεφαλαιώδης. Η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων με περιστρεφόμενη ανοδική πηγή παλαιότερα, απαιτούσε την έκθεση του κρυστάλλου στην ακτινοβολία για αρκετές ώρες ενώ σήμερα αρκούν λίγα μόλις λεπτά. Η δυνατότητα επιλογής του μήκους κύματος της ακτινοβολίας, συμβάλλει πολύ σημαντικά στην επίλυση του προβλήματος φάσης. Τα μικρά μήκη κύματος μειώνουν τόσο την απορρόφηση του κρυστάλλου, όσο και του αέρα, με αποτέλεσμα τη βελτιωμένη σχέση σήματος-θορύβου. Η χρήση μικρών γωνιών επιτρέπει την καταγραφή περισσότερων δεδομένων στο ίδιο φιλμ. Η νεκρή περιοχή του πλέγματος, που είναι απρόσιτη κατά την περιστροφή του κρυστάλλου γύρω από ένα μοναδικό άξονα, είναι αναλογικά μικρότερη απ' ό,τι σε μεγαλύτερο μήκος κύματος [Ζωγράφος, 2000].

Ανιχνευτές ακτίνων-X [Dreath, 2002]

Ο προσδιορισμός της δομής μίας πρωτεΐνης (ή ενός μακρομορίου) με περίθλαση ακτίνων-X απαιτεί την καταγραφή όλων (ή ένα μεγάλο ποσοστό) των σκεδαζόμενων ακτίνων. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει όλα τα κρυσταλλικά σημεία του ανάστροφου πλέγματος να βρεθούν σε κατάσταση περίθλασης, δηλαδή εντός σφαίρας ακτίνας $1/\lambda$ (σφαίρα του Ewald, βλέπε παρακάτω), με περιστροφή του κρυστάλλου. Έτσι, ένα κρυσταλλογραφικό πείραμα απαιτεί τις ακόλουθες συσκευές:

1. Το μηχανισμό περιστροφής του κρυστάλλου

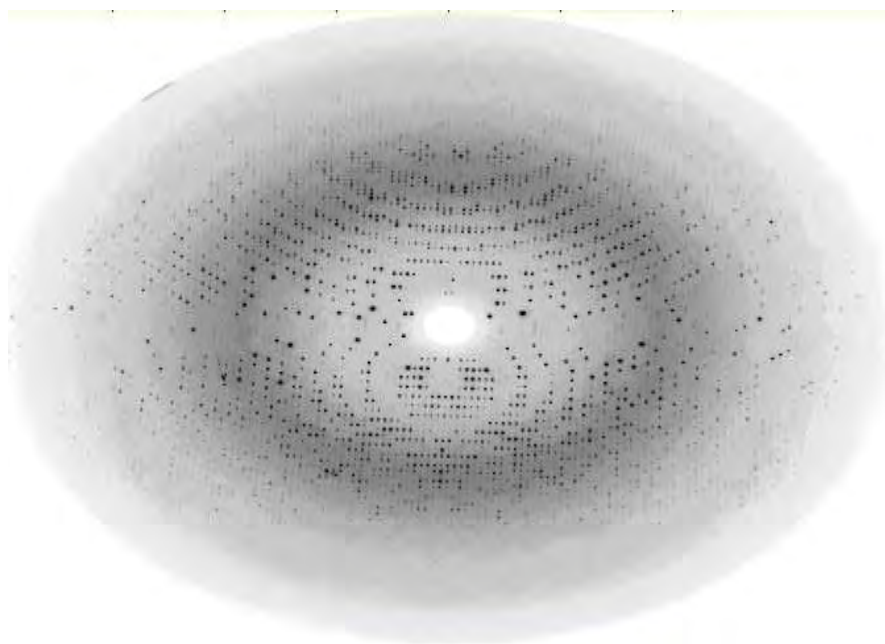
2. Μία συσκευή μέτρησης της θέσης και της έντασης της κάθε περιθλώμενης ακτινοβολίας.



Εικόνα 21: Συσκευή κρυσταλλογραφίας ακτίνων X του εργαστηρίου MAX-lab του Lund University. Κάτω: γωνιόμετρο τοποθετημένο στη ειδική θέση.

Τις τελευταίες δεκαετίες η συλλογή των δεδομένων έχει βελτιωθεί σημαντικά. Αρχικά η καταγραφή γινόταν σε φωτογραφικό φιλμ, ενώ σήμερα γίνεται με συστήματα που μπορούν αυτόματα να μετατρέπουν το σήμα σε ψηφιακή μορφή, αμέσως μετά την έκθεση του κρυστάλλου (Εικόνα 21).

Οι ανιχνευτές πεδιάς (area detectors) (παρόλο που το φωτογραφικό φιλμ και οι τύπου image plate ανιχνευτές ανιχνεύουν περιοχή, ο όρος χρησιμοποιείται για ηλεκτρονικές συσκευές) αποτελούν ηλεκτρονικές συσκευές που ανιχνεύουν φωτόνια σε μία επιφάνεια και η επεξεργασία του σήματος γίνεται αμέσως μετά την ανίχνευση φωτονίων. Η βασική διαφορά είναι ότι οι ανιχνευτές πεδιάς μπορούν να καταγράφουν ταλάντωση 0.1° δίνοντας την τρισδιάστατη εικόνα της κηλίδας, αντίθετα από το φιλμ και τους ανιχνευτές image plate που καταγράφουν πολύ μεγαλύτερη ταλάντωση. Οι ανιχνευτές αυτοί στηρίζονται στην τεχνολογία του θαλάμου ιονισμού αερίων, πολλαπλασιαστή εικόνας (image intensifier) συνδεδεμένο με σύστημα video ή CCD (charge coupled device).



Εικόνα 22. παράδειγμα περιθλασιγράμματος. Το συγκεκριμένο περιθλασίγραμμα προέκυψε από περίθλαση ακτίνων X κρυστάλλου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου εμποτισμένου με έναν αναστολέα του ενζύμου.

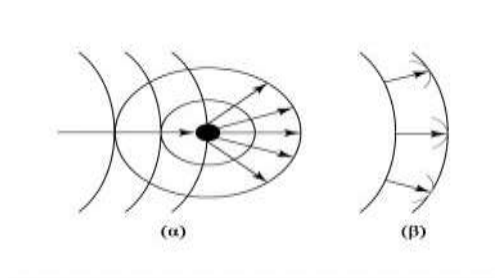
4.6.5 Θεωρία περίθλασης ακτίνων X από κρύσταλλο

Το μήκος της ακτινοβολίας των ακτίνων-X είναι κατάλληλο για τη διάκριση ατόμων σε απόσταση ομοιοπολικού δεσμού. Η ενέργεια ενός κβάντου αυτής της ακτινοβολίας είναι περίπου 8000eV, που είναι περίπου η ενέργεια των ηλεκτρονίων στα ατομικά τροχιακά τους. Αυτή η ισοδυναμία της ενέργειας οδηγεί σε αλληλεπιδράσεις, έτσι ώστε τα ηλεκτρόνια ενός ατόμου να είναι πρώτιστα υπεύθυνα για τη σκέδαση των ακτίνων-X. Ο αριθμός των ηλεκτρονίων σε έναν δεδομένο όγκο του χώρου (η πυκνότητα των ηλεκτρονίων) καθορίζει, πόσο έντονα ένα άτομο σκεδάζει τις ακτίνες-X. Η συμβολή των σκεδαζόμενων ακτίνων-X οδηγεί στο γενικό φαινόμενο της *περίθλασης* [Kensal E. van Holde].

Στην περίθλαση των ακτίνων-X, αντιμετωπίζεται η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ως κύμα. Οι γενικές θεωρίες και οι συνέπειες και οι συνέπειες της περίθλασης ισχύουν για ακτινοβολίες οποιασδήποτε ενέργειας. Η περίθλαση του ορατού φωτός χρησιμοποιείται συχνά για να επεξηγηθούν οι αρχές που διέπουν την περίθλαση των ακτίνων-X από ένα κρύσταλλο [Kensal E. van Holde].

Η σκέδαση αναφέρεται απλά στην ικανότητα των αντικειμένων να αλλάζουν την κατεύθυνση ενός κύματος. Στην περίπτωση του ορατού φωτός, το απλούστερο

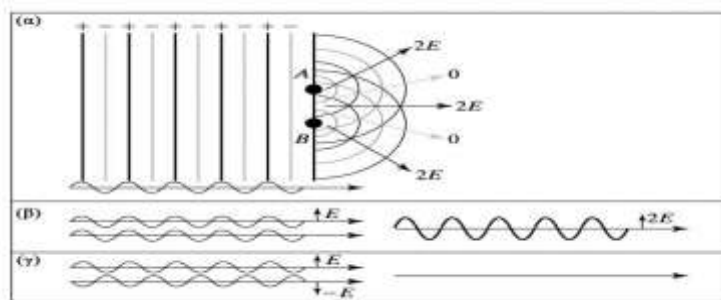
παράδειγμα είναι η ανάκλαση από ένα κάτοπτρο. Το κάτοπτρο αλλάζει απλώς την κατεύθυνση των φωτεινών κυμάτων. Μια ανακλώντα αντικείμενα μπορούν επίσης να σκεδάσουν τα φωτεινά κύματα. Ένα αντικείμενο που τοποθετείται στην πορεία μια φωτεινής δέσμης, προερχόμενης από μια σημειακή πηγή, δεν μπορεί να σχηματίσει σκιά με σαφή όρια, λόγω της σκέδασης από τις ακμές του. Η προέλευση της σκέδασης μπορεί να αναλυθεί καλύτερα με αφετηρία την αρχή του Huygen, η οποία δηλώνει ότι κάθε σημείο ενός μετώπου κύματος μπορεί να θεωρηθεί ως πηγή ενός νέου μετώπου κύματος (Εικόνα 23α). Η ταχύτητα αυτού του νέου μετώπου κύματος είναι ίση με αυτή του αρχικού. Για ένα ανεμπόδιο μέτωπο κύματος, το δευτερογενές μέτωπο μπορεί να κατασκευαστεί σχεδιάζοντας κύκλους ακτίνας $r=vt$ (όπου v είναι η ταχύτητα του κύματος και t είναι ο χρόνος) σε σημεία επί του αρχικού μετώπου και μετά συνδέοντας τις εφαπτόμενες σε κάθε έναν από αυτούς τους κύκλους (Εικόνα 23β). Αντικείμενα, που τοποθετούνται στην πορεία ενός μετώπου κύματος, ενεργούν ως σημεία διάδοσης για τα νέα μέτωπα. Το εντελώς νέο μέτωπο κύματος, που προκύπτει από αυτά, καλείται *σκεδαζόμενο κύμα* [Kensal E. van Holde].



Εικόνα 23. Η αρχή του Huygen για την περίθλαση. (α) Κάθε σημείο της επιφάνειας ενός μετώπου κύματος ενεργεί ως σημείο διάδοσης νέων δευτερευόντων κυμάτων που αθροιστικά σχηματίζουν ένα νέο μέτωπο. Κάθε σημείο του προσπίπτοντος μετώπου κύματος παράγει δευτερεύον κύμα ίδιας ταχύτητας με το προσπίπτον, που αναπαρίσταται ως ένα σύνολο ομόκεντρων κύκλων που εκπέμπονται από το σημείο. (β) Το νέο μέτωπο κύματος διαμορφώνεται με τη σύνδεση των εφαπτόμενων των δευτερευόντων κυμάτων από όλα τα σημεία διάδοσης[Kensal E. van Holde].

Εάν τοποθετήσουμε τώρα δύο σημειακά αντικείμενα (Α και Β) στην πορεία του μετώπου κύματος, κάθε ένα από τα δύο σημεία θα διαδώσει ένα νέο μέτωπο, που θα έχει το ίδιο μήκος κύματος και την ίδια ταχύτητα (Εικόνα 24). Η μετατόπιση στην εμφάνιση των μεγίστων στα πλάτη των δύο κυμάτων (η σχετική φάση τους) εξαρτάται από τις θέσεις του Α και Β ως προς το σημείο προέλευσης του αρχικού

κύματος.



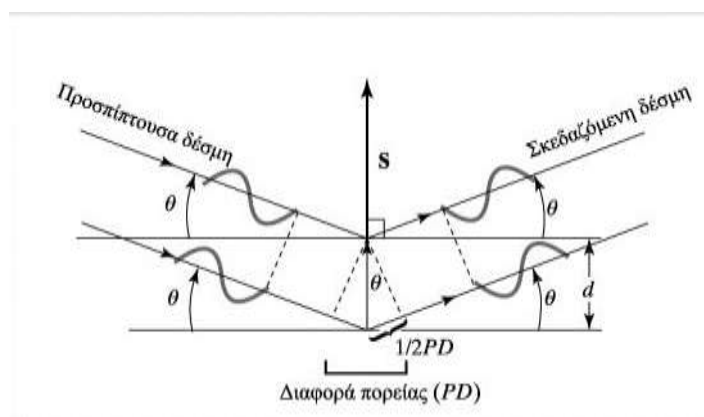
Εικόνα 24. Ενισχυτική και αναιρετική συμβολή σκεδαζόμενων κυμάτων. (α) Δύο σημεία σκέδασης που συναντούν την επιφάνεια ενός προσπίπτοντος μετώπου κύματος λειτουργούν ως σημεία διάδοσης. (β) Τα πλάτη E των προκύπτοντων κυμάτων από τα σημεία σκέδασης αθροίζονται για να διαμορφώσουν ένα νέο κύμα με πλάτος διπλάσιο του αρχικού κατά μήκος των διανυσμάτων $2E$ του (α). (γ) Τα κύματα που είναι 180 εκτός φάσης αλληλοεκμηδενίζονται, δίνοντας συνολικά πλάτος κατά μήκος των διανυσμάτων 0 των (α) [Kensal E. van Holde].

Σε κάποιες θέσεις στον χώρο, το κύμα που διαδίδεται από το A θα ενισχύσει το σκεδαζόμενο από το B, εάν τα δύο σκεδαζόμενα κύματα έχουν την ίδια φάση (ενισχυτική συμβολή). Αντίθετα, εάν τα κύματα έχουν αντίθετη, το κύμα από το A θα μειώσει το πλάτος του κύματος από το B μέσω της αναιρετικής συμβολής. Αυτό το φαινόμενο καλείται *περίθλαση*. Το άθροισμα των κυμάτων που διαδίδονται από το A και το B, δίνει πλάτος κύματος που εξαρτάται τόσο από τις σχετικές θέσεις του A και του B, όσο και από το σημείο παρατήρησης του νέου κύματος. Κατά συνέπεια, από τις παρατηρήσεις των πλατών του νέου μετώπου κύματος σε διαφορετικές θέσεις, να ανάγουμε τις θέσεις των περιθλώντων σημείων A και B σχετικά με την αφετηρία του αρχικού μετώπου. Αυτός είναι ο τρόπος χρησιμοποίησης της περίθλασης των ακτίνων-X για να επιλυθεί η δομή των μορίων στους μονοκρυστάλλους [Kensal E. van Holde].

Ο Νόμος του Bragg

Το 1912, ο W. L. Bragg ανέπτυξε μια απλή σχέση για να εξηγήσει, το πώς η περίθλαση σχετίζεται με τις γενικές θέσεις των σημειακών αντικειμένων στον χώρο.

Για την παραγωγή του νόμου του Bragg για την περίθλαση, αρχικά θα απλοποιηθεί το εννοιολογικό μοντέλο της περίθλασης, θεωρώντας τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος ως παράλληλα επίπεδα. Ένα απλό μοντέλο μονοδιάστατου κρυστάλλου προκύπτει από τη στοίβαξη διαδοχικών παράλληλων ανακλώντων επιπέδων σε ίσες αποστάσεις d (Εικόνα 25). Σε αυτό το μοντέλο, ένα κύμα ακτίνων-X (με μήκος κύματος λ) προσπίπτει στα ανακλώντα υπό γωνία θ . Η ανάκλαση από τα επίπεδα σκεδάζει το κύμα υπό την ίδια γωνία.



Εικόνα 25. Ο νόμος του Bragg για την περίθλαση. Μια δέσμη ακτίνων-X προσπίπτει σε μια περιοδική διάταξη ανακλώντων επιπέδων υπό γωνία θ και ανακλάται υπό την ίδια γωνία. Η ενισχυτική συμβολή των ανακλώμενων ή σκεδαζόμενων ακτίνων-X συμβαίνει, όταν η διαφορά πορείας PD μεταξύ των ανακλώμενων δεσμών από διαδοχικά επίπεδα (σε απόσταση d μεταξύ τους) είναι ίση με το ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος. Το διάνυσμα σκέδασης S είναι κάθετο στα ανακλώντα επίπεδα και το μέτρο του είναι ίσο με το αντίστροφο της απόστασης μεταξύ των επιπέδων ανάκλασης[Kensal E. van Holde].

Δεδομένου, ότι η απόσταση του σημείου παρατήρησης είναι πολύ μεγάλη έναντι του d , οι ανεξάρτητες διαδρομές του σκεδαζόμενου φωτός θα είναι ουσιαστικά παράλληλες. Έχοντας ένα μεγάλο αριθμό επιπέδων, παρατηρείται ενισχυτική συμβολή μόνο όταν τα ανακλώμενα κύματα είναι ακριβώς εν φάσει (κορυφές κυμάτων που ευθυγραμμίζονται με κορυφές, κόμβοι με κόμβους, και κοιλάδες με κοιλάδες). Αυτή η συνθήκη ικανοποιείται, μόνο όταν η διαφορά μεταξύ του μήκους διαδρομής του προσπίπτοντος και του ανακλώμενου κύματος, PD , είναι ίση με ακέραιο (n) πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας

ακτίνων-X [Kensal E. van Holde].

$$PD = n\lambda \quad (1)$$

Αυτή η διαφορά στα μήκη των διαδρομών συσχετίζεται με την απόσταση που χωρίζει τα ανακλώντα επίπεδα με την απλή τριγωνομετρική σχέση,

$$\frac{1}{2}PD = d \sin \theta \quad (2)$$

Αντικαθιστώντας την εξίσωση (2) στην (1), παράγεται ο νόμος του Bragg για την περίθλαση

$$2d \sin \theta = n \lambda \quad (3)$$

ή

$$\frac{2 \sin \theta}{\lambda} = \frac{n}{d} \quad (4)$$

Αυτή η απλή σχέση διατυπώνει δύο θεμελιώδεις προτάσεις σχετικά με τις ιδιότητες της περίθλασης. Καταρχήν, από την εξίσωση (3) αποδεικνύεται ότι οι γωνίες στις οποίες παρατηρείται η περίθλαση είναι κβαντισμένες για ακέραιες τιμές του n (0,1,2,...). Για έναν στοίχο άπειρων σκεδαστών, η μόνη προϋπόθεση για να παρατηρηθεί μια ανάκλαση, είναι να ικανοποιείται ο νόμος του Bragg. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η σκεδαζόμενη ακτινοβολία εκμηδενίζεται [Kensal E. van Holde].

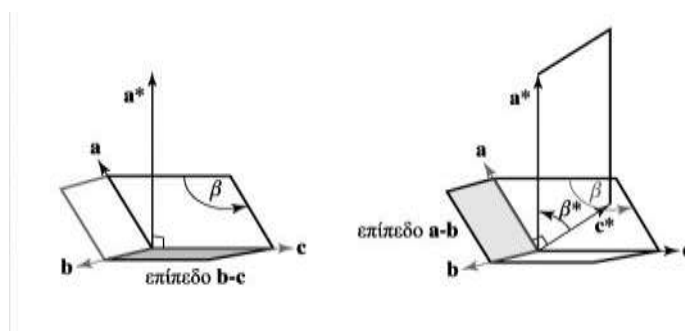
Δεύτερον, υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της γωνίας Bragg (θ) και της ισαπόστασης μεταξύ των ανακλώντων επιπέδων (d). Αυτό σημαίνει, ότι μεγαλύτερες αποστάσεις μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μονάδων σε ένα κρύσταλλο οδηγούν σε μικρότερες γωνίες περίθλασης. Εναλλακτικά, μπορεί να μετασχηματιστεί η αντίστροφη σχέση σε ευθεία αναλογία με τον καθορισμό ενός νέου μεγέθους, του διανύσματος σκέδασης (\mathbf{S}). Το διάνυσμα σκέδασης έχει μέτρο $|\mathbf{S}| = \frac{n}{d}$, και διεύθυνση κάθετη προς το ανακλών επίπεδο. Έτσι η εξίσωση (4) μπορεί να ξαναγραφεί ως

$$\frac{2 \sin \theta}{\lambda} = \frac{n}{d} = |\mathbf{S}| \quad (5)$$

όπου το \mathbf{S} έχει μονάδες αντιστρόφου μήκους, και συνεπώς, επιτρέπει να εισαχθεί μια έννοια γνωστή ως «αντίστροφος χώρος». Το \mathbf{S} εξετάζεται ως ένας τρόπος συσχέτισης της γεωμετρίας των ανακλώντων επιπέδων με την απόσταση που χωρίζει τις παρατηρούμενες ανακλάσεις (Εικόνα 25) [Kensal E. van Holde].

Ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα και η σφαίρα του Ewald

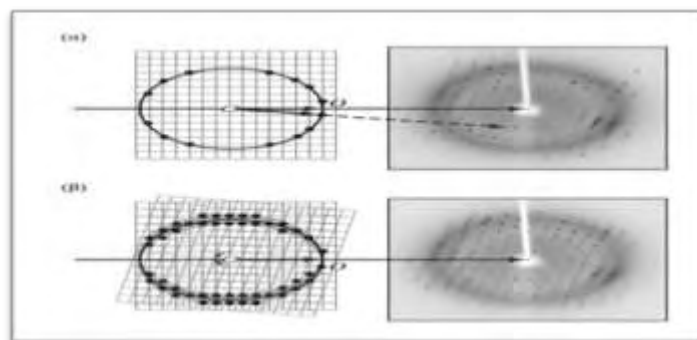
Το περιθλασίγραμμα χαρακτηρίζεται από κηλίδες που έχουν συγκεκριμένη γεωμετρία, συμμετρία και ένταση. Η κάθε κηλίδα χαρακτηρίζεται από τρεις συντεταγμένες που δεν είναι τίποτα άλλο από τους δείκτες Miller που χρησιμοποιήσαμε για να χαρακτηρίσουμε τα παράλληλα κρυσταλλογραφικά επίπεδα. Οι κηλίδες έχουν συντεταγμένες που ανήκουν σε ένα υποθετικό σύστημα συντεταγμένων, το ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα, που βοήθα στον καθορισμό της διεύθυνσης των κυμάτων. Το ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα μπορούμε να το χαρακτηρίσουμε γεωμετρικά όπως και το πραγματικό. Στην Εικόνα 26 παρουσιάζονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά μιας ανάστροφης στοιχειώδους κυψελίδας σύμφωνα με αυτά της πραγματικής.



Εικόνα 26. Κατασκευή μιας μοναδιαίας κυψελίδας του αντίστροφου χώρου (αντίστροφη μοναδιαία κυψελίδα) από μία μοναδιαία κυψελίδα του πραγματικού χώρου [Kensal E. van Holde].

Το 1921, ο Edwald εισήγαγε για τη περιγραφή του φαινομένου της περίθλασης, τη χρήση μιας γεωμετρικής κατασκευής η οποία απλοποιεί σε μεγάλο ποσοστό την περιγραφή του φαινομένου. Η κατασκευή αυτή συνίσταται από μια σφαίρα με κέντρο, O , τον κρύσταλλο (Εικόνα 27). Οι ανακλάσεις θα εισέρχονται και θα εξέρχονται από τη σφαίρα, επιτρέποντας τη μέτρηση των ανακλάσεων από

διαφορετικές περιοχές του αντίστροφου πλέγματος. Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, για την παρατήρηση μιας περίθλασης το σημείο hkl του ανάστροφου πλέγματος πρέπει να ανήκει στη σφαίρα ανάκλασης. Αυτό επιτυγχάνεται με περιστροφή του κρυστάλλου.



Εικόνα 27: Περιθλασιγράμματα από ακίνητη και περιστροφική ταλάντωση. Περίθλαση που προκύπτει από την τομή των σημείων του αντίστροφου πλέγματος με τη σφαίρα Ewald. (α) Εάν ο κρύσταλλος διατηρείται ακίνητος, η πιθανότητα τομής είναι μικρή, με συνέπεια να παρατηρούνται σχετικά λίγες ανακλάσεις. (β) Όταν ο κρύσταλλος περιστρέφεται, το αντίστοιχο πλέγμα περιστρέφεται επίσης (κατά την ίδια φορά αλλά περί το σημείο O) και τέμνει τη σφαίρα Ewald σε άλλα σημεία, επιτρέποντας την παρατήρηση περισσότερων ανακλάσεων (σκιασμένες περιοχές) [Kensal E. van Holde].

Υπολογισμός ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $\rho(x, y, z)$ - Μετασχηματισμός Fourier

Το περιθλασίγραμμα (Εικόνα 22) αποτελεί τον μετασχηματισμό Fourier της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, και αντίστροφα, η ηλεκτρονιακή πυκνότητα αποτελεί τον ανάστροφο μετασχηματισμό Fourier του περιθλασιγράμματος. Αναλυτικότερα, η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας εξαρτάται από τη σκεδαστική ικανότητα των ξεχωριστών ατόμων (ατομικός παράγοντας f) και τη φάση των κυμάτων από κάθε πηγή σκέδασης. Ο παράγοντας δομής, F , για κάθε επίπεδο μπορεί να οριστεί ως το άθροισμα των ατομικών παραγόντων σκέδασης f_i , πολλαπλασιασμένων με έναν παράγοντα φάσης, a_i , για το κάθε άτομο:

$$F = \sum f_j a_j \quad (6)$$

Η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας είναι ανάλογη με την τιμή του πλάτους του παράγοντα δομής. Ο παράγοντας δομής F_{hkl} , που αντιστοιχεί στο ανακλώμενο κύμα από το επίπεδο hkl (hkl : δείκτες Miller που προσδιορίζουν ένα επίπεδο του

κρυσταλλικού πλέγματος), εκφράζεται με ένα μιγαδικό αριθμό πλάτους $|F_{hkl}|$ και φάσης φ_{hkl} , δηλαδή: $F_{hkl} = |F_{hkl}| \exp(i\varphi_{hkl})$ (7) (τα ατομικά ζεύγη των συντεταγμένων να είναι γνωστά).

Η μετατροπή των παραγόντων δομής σε ατομικές συντεταγμένες γίνεται με τη χρήση του μετασχηματισμού Fourier,

$$p(r) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F_{hkl}| \exp(-2\pi i \varphi_{hkl}) \quad (8)$$

Υπολογίζεται έτσι, η συνάρτηση κατανομής της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $p(r)$ (οι ακτίνες-X σκεδάζονται μόνο από τα ατομικά ηλεκτρόνια) και οι ατομικές θέσεις αντιστοιχούν στα μέγιστα της $p(r)$.

Τα πειράματα περίθλασης ακτίνων-X μπορούν να δώσουν πληροφορίες μόνο για την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας, που είναι ανάλογη του τετραγώνου του πλάτους του παράγοντα δομής ($I_{hkl} \sim |F_{hkl}|^2$), ενώ δεν μπορούν να δώσουν καμιά πληροφορία για την φάση, φ_{hkl} , του παράγοντα δομής. Αυτό είναι ένα πρόβλημα που ονομάζεται ‘πρόβλημα των φάσεων’ και είναι κεντρικό στον κρυσταλλογραφικό προσδιορισμό των δομών [Taylor W., 2003].

Σε περίπτωση που τμήμα ενός μορίου μιας άλλης δομής υπάρχει στην υπό μελέτη δομή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το μοντέλο αυτό έτσι ώστε να ληφθούν οι απώστες φάσεις. Το μοντέλο στρέφεται και μεταφέρεται στον χώρο έτσι ώστε τα μέτρα των δομικών παραγόντων $|F_c(hkl)|$, να πλησιάζουν αυτά των πειραματικών $|F_o(hkl)|$. Η μέθοδος αυτή καλείται μοριακή αντικατάσταση. Μέτρο σύγκρισης της ταύτισης του μοντέλου με τα πειραματικά αποτελέσματα αποτελεί ο κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας που ορίζεται ως:

$$R = \frac{\sum_{hkl} (|F_o(hkl)| - |F_c(hkl)|)}{\sum_{hkl} (|F_o(hkl)|)} \quad (9)$$

όπου ειδικά για την κρυσταλλογραφία μακρομορίων ένα μοντέλο με δείκτη αξιοπιστίας $R=0.2-0.3$ είναι αξιόπιστο. Επίσης, ένας άλλος δείκτης της ποιότητας του μοντέλου (πιο αξιόπιστος σε σύγκριση με τον πιο πάνω) αποτελεί ο R_{free} που αντιστοιχεί στον κρυσταλλογραφικό δείκτη αξιοπιστίας R για ένα 5% ανακλάσεων που δεν έχουν συμπεριληφθεί στη βελτιστοποίηση.

4.6.6 Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου

Η ποιότητα του υπολογιζόμενου χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας εξαρτάται πολύ από την ποιότητα των πειραματικών δεδομένων και από το μοντέλο. Η ποιότητα των δεδομένων δεν μπορεί να αλλαχθεί, εκτός και εάν πραγματοποιηθεί ανάπτυξη νέων κρυστάλλων και συλλεχθούν καλύτερα δεδομένα περίθλασης. Εντούτοις μπορεί να γίνει βελτίωση του μοντέλου με βελτιστοποίηση της δομής, ώστε να ταιριάζει καλύτερα με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Σε αυτή την διαδικασία βελτιστοποίησης, το μοντέλο υποβάλλεται σε μικρές αλλαγές για την βελτίωση των λεπτομερειών του. Θα μπορούσαν απλά να προσαρμόσουν το μοντέλο οπτικά στους υπολογιζόμενους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας. Υπάρχει όμως ένα πρόβλημα με τους υπολογιζόμενους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας από παράγοντες δομής που προέρχονται από τις παρατηρηθείσες εντάσεις. Μόνο το $|\mathbf{F}(\mathbf{S})_{\text{obs}}|$ μπορεί να προσδιοριστεί από τα δεδομένα έντασης. Οι πληροφορίες φάσεων μπορούν να υπολογιστούν μόνο από το μοντέλο, $\mathbf{F}(\mathbf{S})_{\text{calc}}$. Αυτό σημαίνει ότι το μοντέλο επηρεάζει έντονα τους χάρτες [Kensal E. van Holde].

Ένα αντικειμενικότερο κριτήριο για την αξιολόγηση του πόσο καλά ένα μοντέλο συμφωνεί με τα δεδομένα είναι ο δείκτης αξιοπιστίας R (ή παράγοντας R)

$$R = \frac{\sum ||\mathbf{F}(\mathbf{S})_{\text{obs}}| - |\mathbf{F}(\mathbf{S})_{\text{calc}}||}{\sum |\mathbf{F}(\mathbf{S})_{\text{obs}}|} \quad (6)$$

Σε αυτήν την περίπτωση, συγκρίνονται μόνο τα μέτρα των μετρηθέντων και υπολογισθέντων παραγόντων δομής. Γενικά, οι δείκτες αξιοπιστίας R κυμαίνονται μεταξύ του 70% (0,7) για ένα τυχαίο «ταίριασμα» και μίας τιμής που πλησιάζει το 0% για ένα ιδανικό τέλειο ταίριασμα. Ένα ιδανικό ταίριασμα δεν είναι επιτεύξιμο, πρώτιστα λόγω των εγγενών περιορισμών στην ποιότητα των δεδομένων και των ατελειών στον κρύσταλλο. Ένας γενικός κανόνας για τα μακρομόρια είναι, ότι ένα μοντέλο μπορεί να προταθεί ως μια λύση στη δομή, όταν η βελτιστοποίηση φθάσει ως έναν παράγοντα R 20% (0,2) ή καλύτερο. Για να επιτευχθεί αυτό το επίπεδο σχηματισμού μεταξύ του μοντέλου και των δεδομένων, πρέπει να ορισθεί με ακρίβεια η δομή του μακρομορίου μαζί με ένα μεγάλο ποσοστό του διαλύτη. Δυστυχώς, ένας χαμηλός παράγοντας R μπορεί να επιτευχθεί τεχνικά και για ένα ανακριβές μοντέλο, προσθέτοντας απλώς περισσότερο διαλύτη για να καλυφθεί η ηλεκτρονιακή πυκνότητα σε διάφορα μέρη της μοναδιαίας κυψελίδας. Έτσι, η επίλυση της δομής

ενός μακρομορίου από τα δεδομένα περίθλασης των ακτίνων-Χ εξαρτάται πολύ από την κατασκευή αλλά και από την ποιότητα των μοριακών μοντέλων. Στη διαδικασία αυτή, υπάρχει ένας αριθμός βημάτων, όπου μπορεί να παρεισφρήσει η υποκειμενική προτίμηση. Ευτυχώς, είναι διαθέσιμα διάφορα αντικειμενικά κριτήρια για την αξιολόγηση της ποιότητας των προκύπτοντων μοντέλων.

Πρόσφατα, οι κρυσταλλογράφοι έχουν αναγνωρίσει την ανάγκη ύπαρξης ενός μέτρου αξιολόγησης της συμβατότητας του μοντέλου, χωρία αυτό να προκαταλαμβάνεται από το ίδιο μοντέλο. Η προσέγγιση που χρησιμοποιείται τώρα ευρέως είναι η εξής: Αρχικά διαχωρίζεται ένα μέρος (περίπου 5% έως 10%) από τα συνολικά πειραματικά δεδομένα για να χρησιμοποιηθεί ως σετ δεδομένων ελέγχου. Το μοντέλο βελτιστοποιείται μόνο ως προς τα υπόλοιπα δεδομένα (σετ δεδομένων εργασίας). Κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης του μοντέλου, ο παράγοντας R (Εξίσωση 6) υπολογίζεται τόσο για το σετ δεδομένων εργασίας όσο και για το σετ ελέγχου. Ο δεύτερος παράγοντας R καλείται R_{free} , αναγνωρίζοντας ότι θα πρέπει να είναι απαλλαγμένος από την επίδραση του μοντέλου. Εάν κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης το μοντέλο βελτιώνεται πραγματικά (αντικειμενικά), τότε ο R_{free} , θα πρέπει να συνεχίσει να μειώνεται. Από κάποιο σημείο, ωστόσο, ο R_{free} θα πάψει να μειώνεται και ακόμα και αν η περαιτέρω βελτιστοποίηση ή οι προσθήκες στο μοντέλο μειώνουν τον παράγοντα R των δεδομένων εργασίας, το μοντέλο θεωρείται ότι έφθασε πλέον το επίπεδο ποιότητας που του επιτρέπουν τα δεδομένα. Με περαιτέρω προσθήκες στο μοντέλο, ο R_{free} μπορεί όντως να αρχίσει να αυξάνεται, ακόμη και όταν ο R για το σετ δεδομένων εργασίας αρχίζει να μειώνεται. Αυτό μαρτυρά, ότι τα δεδομένα είναι πλέον υπερπροσαρμοσμένα (περισσότερες μεταβλητές από ό,τι τα δεδομένα επιτρέπουν) [Kensal E. van Holde].

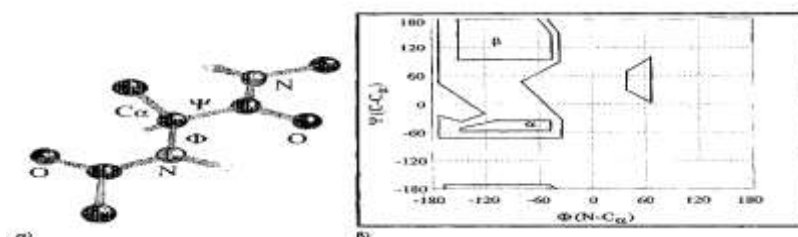
4.6.7 Έλεγχος του δομικού μοντέλου

Μετά την βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου, είναι απαραίτητος ο έλεγχος αυτού έτσι ώστε να αποφευχθούν λάθη στην ερμηνεία της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Η εκτίμηση μπορεί να γίνει με προσεκτικό έλεγχο του μοντέλου και της ηλεκτρονιακής πυκνότητάς του αλλά και την εξαγωγή διαφόρων στατιστικών παραμέτρων και διαγραμμάτων που βοηθούν στην αξιολόγηση του μοντέλου. Εκτός από την ορθότητα της ερμηνείας της ηλεκτρονιακής πυκνότητας πρέπει τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά

του μοντέλου (γωνίες, μήκη δεσμών) να μην αποκλίνουν από αυτές των μικρών μορίων αλλά και αυτές των βάσεων δεδομένων, όπως επίσης και τα στερεοχημικά χαρακτηριστικά του να είναι ελεγμένα (πεπτιδικό δεσμοί, διέδρες γωνίες πλευρικών ομάδων και στερεοχημική παρεμπόδιση) [Τσιτσάνου, 2001].

Διάγραμμα Ramachandran

Η στερεοχημεία της κύριας αλυσίδας πρωτεϊνικού μορίου μπορεί να διερευνηθεί με το διάγραμμα Ramachandran, στο οποίο οι διέδρες γωνίες ϕ και ψ για κάθε κατάλοιπο καταχωρούνται σε διάγραμμα όπως αυτό που φαίνεται στο Σχήμα β. Ο G.N. Ramachandran παρατήρησε ότι τα αμινοξέα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν μπορούν να έχουν οποιοδήποτε ζεύγος ϕ και ψ . Μερικοί συνδυασμοί δεν είναι δυνατοί λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Στην περίπτωση που εξαχθεί το διάγραμμα για κάποιο μοντέλο πρέπει όλα τα κατάλοιπα να βρίσκονται σε περιοχές που είναι επιτρεπτές, διαφορετικά το μοντέλο πρέπει να επανεξεταστεί για τα κατάλοιπα που παρουσιάζουν λάθος στερεοχημεία.



Εικόνα 28: α) Ορισμός των ϕ (C α -N) και ψ (C α -C) διέδρων γωνιών και β) το διάγραμμα Ramachandran για κατάλοιπα εκτός γλυκίνης (περιοχή χωρίς γράμματα) ενώ η περιοχή α: δεξιόστροφη α -έλικα και η περιοχή β: αντιπαράλληλη-παράλληλη πτυχωτή επιφάνεια [Rhodes].

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μυς κουνελιού

Η απομόνωση της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Fischer & Krebs (1962), με μικρές μόνο τροποποιήσεις (χρησιμοποίηση 2-μερκαπτοαιθανόλης αντί L-κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα) [Melpidou and Oikonomakos, 1983].

Υλικά:

- Κουνέλια ποικιλίας *oryctolacus cunicullus* (3 αρσενικά μετρίου μεγέθους)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO₃)
- Διάλυμα οξικού οξέος CH₃COOH 1N
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90%, 3.6M
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris [τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου]/HCl 0.001M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M (αρύθμιστου pH)
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH 7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH 7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg 1.0M
- Γλυκερόλη
- Μεμβράνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1% NaCO₃ και 10mM EDTA στους 100°C, συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους και αποθήκευση σε 20% αιθανόλη στους 4°C)

Όργανα:

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός

Πορεία:

Βήμα 1^ο: Παραλαβή μυϊκού ιστού και εκχύλιση του ενζύμου από αυτόν.

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μυς από 3 κουνέλια. Οι μυς αλέθονται με μηχανή κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσες με απιονισμένο ύδωρ εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα **30 λεπτά**. Το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

Βήμα 2^ο: Όξινη καταβύθιση άλλων ενζύμων

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος CH_3COOH 1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο. Λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών, η θολρότητα του εκχυλίσματος αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (5000rpm) για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C. Το υπερκείμενο διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κορεσμένο KHCO_3 και ογκομέτρηση του διαλύματος.

Βήμα 3^ο: Καταβύθιση με θειϊκό αμμώνιο

Το ένζυμο καταβυθίζεται με θειϊκό αμμώνιο κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε L ενζυμικού διαλύματος. Το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για περίπου 16 ώρες. Στη

συνέχεια το υπερκείμενο αποχύνεται με χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στα 5000rpm για 30min σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001M (pH 7.5) για 16 ώρες.

Βήμα 4^ο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Το διάλυμα συλλέγεται και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 5500rpm για 30min στους 0-4°C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M pH 7.0 όγκου ίσο με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, διαλύματος EDTA 0.1M pH 7.0 ίσο με το 5×10^{-3} του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και αλκαλικού διαλύματος Tris για ρύθμιση του pH στα 8.8. Μετά από επώαση του μίγματος στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH_3COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και το υπερκείμενο (ενζυμικό διάλυμα) ογκομετράται.

Βήμα 5^ο: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 1ml AMP 0.1M (pH 7.0) και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1M (pH 7.0) ανά 100mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης, (το AMP και το $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ διευκολύνουν την κρυστάλλωση). Το μίγμα αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραίωσης ($\beta\text{-GP/Merc/EDTA}$, 50:50:1, pH 6.8).

Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500rpm για 10min σε θερμοκρασία 25-30°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 6h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση

γίνεται απουσία AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$.

Βήμα 6^ο: Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου

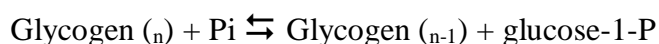
Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης β γλυκογόνου μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C. Προσδιορίζεται η ενζυμική συγκέντρωση με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης. Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20 °C.

2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου. Ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος), ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου **Glycogen_(n)**, προς **Glycogen_(n-1)** και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης **glucose-1-P**.



Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η *αντίθετη αντίδραση*. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, δηλαδή μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα (P_i) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.

Πορεία:

Δείγμα από το ενζυμικό παρασκεύασμα αραιώνεται και λαμβάνεται το εναιώρημα ενζύμου περιεκτικότητας ~500 $\mu\text{g/mL}$. Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25 μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 0.2% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου 5% (v/v). Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται επίσης το υπόστρωμα για $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ 2.0mM με προσθήκη 200 μL υποστρώματος $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ 9.0mM, 18 μL AMP 50mM και 502 μL H_2O (κατάλληλο

για τέσσερα δείγματα).

Τοποθετείται το ενζυμικό μίγμα για επώαση στους 30°C επί 15 λεπτά και το υπόστρωμα επί περίπου 3 λεπτά. Μετά την επώαση, 180μL από το ενζυμικό μείγμα προστίθενται στον σωλήνα του υποστρώματος για να ξεκινήσει η αντίδραση. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση έχουμε: 5.0μg ένζυμου ανά mL, 1.0mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υπόστρωμα α-D- Glc-1-P 2.0mM, 50mM υδροχλωρικής τριαιθανολαμίνης, 100mM KCl και 1mM DTT. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (ενός λεπτού) λαμβάνονται δείγματα των 200μL από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50μL SDS 1.0% (παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται). Στα δείγματα γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως α-D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της παρουσίας φωσφορικών).

2.2 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m , mol) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α-D- Glc-1-P).

Πορεία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 5% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ένζυμου 5% (v/v). Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α-D- Glc-1-P 2.0, 4.0, 6.0, 10 και 20mM, με προσθήκη 200μL από το αντίστοιχο υπόστρωμα α-D- Glc-1-P, 18μL AMP 50mM και 502μL H₂O.

Το ενζυμικό μείγμα τοποθετείται για επώαση στους 30°C επί 15 λεπτά και τα υποστρώματα επί περίπου 3 λεπτά. Στη συνέχεια, για την εκκίνηση της αντίδρασης σε όλους τους σωλήνες των υποστρωμάτων σταδιακά προστίθενται 180μl ενζυμικού

μίγματος. Στις συνθήκες αυτές, στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση, έχουμε: 5.0μg ένζυμο/mL, AMP 1.0mM, γλυκογόνο 1%, υπόστρωμα α-D- Glc-1-P 2.0-20mM, 50 mM υδροχλωρικής τρις-αιθανολαμίνης, 100 mM KCl και 1 mM DTT. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8. Κάθε ένα λεπτό (σε χρόνους 1',2',3',4') λαμβάνονται δείγματα των 200μL από το μείγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50μL SDS 1.0% .

Στα δείγματα γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως α-D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών).

2.3 Προσδιορισμός IC₅₀ αναστολέα

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής [Segel, 1975].

Οι αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου δρουν σύμφωνα με την πλήρως συναγωνιστική αναστολή (fully competitive inhibition), αφού η σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο εμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος και κατ' επέκταση τη δράση του ενζύμου. Σύμφωνα με το μοντέλο της πλήρους συναγωνιστικής αναστολής, ο αναστολέας συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου «μιμούμενος» το υπόστρωμα και εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

Η σταθερά IC₅₀ ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή του IC₅₀ και για συγκεκριμένη συγκέντρωση G1P (1-φωσφορικής γλυκόζης).

Υλικά :

Απιονισμένο ύδωρ

Διάλυμα ενζύμου

Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης (α-D- Glc-1-P) 18mM

Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) 50mM

Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50mM β-φωσφογλυκερόλης (β- GP), 50mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA)

Γλυκογόνο 1 % (w/v)

Διάλυμα SDS 1%

Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1mM, pH= 6.8

Διάλυμα του αναστολέα

Όργανα:

Υδατόλουτρο (ρυθμισμένο να διατηρεί τη θερμοκρασία πάντα στους 30° C.)

Φασματοφωτόμετρο (ρυθμισμένο στα 850nm)

Δοκιμαστικούς σωλήνες

Ζυγός

Πιπέτες

Συσκευή vortex

Συσκευή μέτρησης pH (pH μετρο)

Χρονόμετρο

Πορεία :

2.3.1 Παρασκευή διαλύματος GPb-γλυκογόνου

Από το εναιώρημα του ενζύμου που φυλάσσεται σε γλυκερόλη παίρνουμε 10μl και το αραιώνουμε σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκεντρώσεως της GPb, με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής $b=1\text{cm}$ (ξέρουμε πως ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του ενζύμου είναι 1.32).

Εν συνεχεία παρασκευάζεται ενζυμικό διάλυμα σε δοκιμαστικό σωλήνα το οποίο περιέχει 25μg/mL GPb, γλυκογόνο 10% w/v, και ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 5% v/v, έτσι ώστε με την προσθήκη του διαλύματος με το υπόστρωμα η αντίδραση να λαμβάνει χώρα στις εξής συνθήκες: ένζυμο 5.0 μg/ mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0.2 % w/v και υπόστρωμα α-D- Glc-1-P σταθερής συγκέντρωσης και αναστολέα μεταβαλλόμενης. Στη συνέχεια το

ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση 15 min σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 30°C.

2.3.2 Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος

Αξιολόγηση παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού σε διάλυμα DMSO:

Παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η IC₅₀. Η σταθερή συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P είναι 9mM, του AMP 50mM και του DMSO 100%. Μετά την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος (180μl) η συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P είναι 2 mM, της AMP 1mM και του DMSO 2%. Επίσης συμπληρώνεται με απιονισμένο ύδωρ μέχρι τελικού όγκου 720 μL (Πίνακας 3). Τέλος σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα.

Πίνακας 3:

	Control	Διάλυμα με αναστολέα
α-D- Glc-1-P (9mM)	200 μL	200 μL
AMP (50mM)	18 μL	18 μL
Αναστολέας	-	18 μL
DMSO 100%	18 μL	-
H₂O	484 μL	484 μL
Τελικός όγκος (V_T)	720μL	720μL

*DMSO: Είναι ένα άχρωμο, ελαιώδες, ελαφρά ιξώδες υγρό. Διαλύει εύκολα μη πολικές ενώσεις και πολλά ανόργανα άλατα.

Αξιολόγηση παραπροϊόντων αμπελοκομίας σε υδατικό διάλυμα:

Παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η IC₅₀, και σταθερή συγκέντρωση α-D- Glc-1-P 9mM και AMP 50mM ώστε μετά την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος (180μl) η συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P να είναι 4 mM και της AMP 1mM. Επίσης συμπληρώνεται με απιονισμένο ύδωρ μέχρι τελικού όγκου 720 μL (Πίνακας 4). Τέλος σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα.

Πίνακας 4:

	Control	Διάλυμα με αναστολέα
α-D- Glc-1-P (9mM)	200 μ L	200 μ L
AMP (50mM)	18 μ L	18 μ L
Αναστολέας	-	X μ L
H₂O	502 μ L	720-(200+18+X) μ L
Τελικός όγκος (V_T)	720 μ L	720 μ L

Τα διαλύματα υποστρώματος τοποθετούνται πριν την εκτέλεση του πειράματος στο υδατόλουτρο ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με το ενζυμικό διάλυμα.

2.3.3 Εκτέλεση του πειράματος

Μετά την επώση του ενζυμικού διαλύματος, μεταφέρονται 180 μ l από το ενζυμικό μίγμα στον χρόνο 0 σε κάθε διάλυμα υποστρώματος όγκου 720 μ L, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Ακολούθως, ανά 1 λεπτό (σε χρόνους 1', 2', 3', 4'), λαμβάνονται από 200 μ L και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μ L SDS 1%. Έτσι σταματά η ενζυμική αντίδραση, αφού παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε μια διαφορετική συγκέντρωση αναστολέα.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί προστίθενται 2.5 ml διαλύματος ασκορβικού οξέος – μολυβδαινικού αμμωνίου (βλ. Πειραματικό μέρος §2.4) σε αναλογία 1/4 ανά δοκιμαστικό σωλήνα, σε ίσα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα επωάζονται στους 30°C για 15min και ακολουθεί φωτομέτρηση τους σε μήκος κύματος 850nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των Pi που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση. Ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Graffit (βλ. Πειραματικό μέρος §2.6), προκειμένου να προσδιοριστεί η IC₅₀. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά α -D- Glc-1-P, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της, αλλά και του ενζυμικού διαλύματος, λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.

2.4 Προσδιορισμός φωσφόρου

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στην βιοχημεία, κυρίως στον προσδιορισμό δραστικότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η ελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου. Η χρησιμότητα του προσδιορισμού του ανόργανου φωσφόρου οδήγησε σε μια συνεχή τροποποίηση και βελτιστοποίηση της αρχικής μεθόδου που προτάθηκε από τους Fiske και Subbarow (1925).

Μέθοδος ασκορβικού οξέος [Saheki et al, 1985]

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm.

Υλικά(Τα παρακάτω διαλύματα παρασκευάζονται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα):

Διάλυμα μολυβδαινίου, pH 5.0 (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως). Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με ατμίζων HCl 10N.

Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N. Ανάμιξη 4:1 όγκου αντιδραστηρίου μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος. Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από **15 min** από την παρασκευή του(δλδ. ανάμιξη) και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (>3hrs).

Πορεία:

Στα δείγματα που λαμβάνονται από το κινητικό πείραμα προστίθενται 2.5mL από το αντιδραστήριο χρώσης. Μετά από ισχυρή ανάμιξη με Vortex οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30° C για **15min**. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850nm. Επίσης γίνεται προσδιορισμός σε πρότυπο δείγμα φωσφορικών.

2.5 Παρασκευή τυφλών

Η μέθοδος προσδιορισμού της IC_{50} βασίζεται στον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb. Γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να διορθωθούν οι απορροφήσεις λόγω της παρουσίας ορθοφωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από την δράση του ενζύμου. Έτσι παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά :

- Τυφλό νερού για τον μηδενισμό του φωτομέτρου.
- Τυφλό με την συγκέντρωση της α -D- Glc-1-P που χρησιμοποιείται, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της.
- Τυφλό γλυκογόνου (ενζυμικού διαλύματος) λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.
- Παρασκευάζονται από δυο τυφλά για κάθε περίπτωση, εκτός του νερού, και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων τους. Επίσης, παρασκευάζεται γνωστό πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων από την οπτική απορρόφηση του όποιου, εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε $\mu\text{mol Pi}$.

2.6 Διαδικασία επεξεργασίας εκχυλισμάτων παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού και παραπροϊόντων αμπελοκομίας

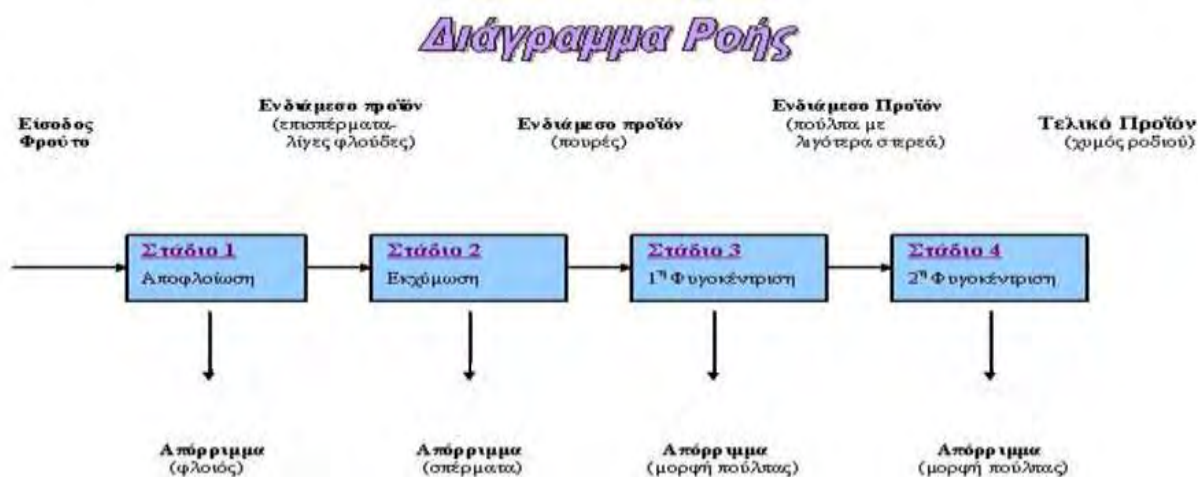
Παραπροϊόντα αμπελοκομίας:

Πενήντα γραμμάρια αποξηραμένου δείγματος εκχυλίζεται σε ένα μίγμα 200 mL μεθανόλης (MeOH) / H_2O /1.0 N HCl (90:9.5:0.5 v / v) και επεξεργάστηκε στη συνέχεια για 10 λεπτά με υπερήχους (μπανάκι υπερήχων). Ο διαλύτης διαχωρίστηκε με διήθηση, και το υπόλοιπο στερεό επανα-εκχυλίστηκε τρεις φορές, χρησιμοποιώντας τον ίδιο διαλύτη. Τα εκχυλίσματα εξατμίστηκαν υπό κενό, το εναίωρημα διαλύθηκε σε 30 mL $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά (7000 rpm). Το υπερκείμενο εκχυλίστηκε με πετρελαϊκό αιθέρα (3X30 mL) με σκοπό την απομάκρυνση των λιπιδίων και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το διάλυμα που απέμεινε χύθηκε σε 30 ml άλμης και επανεκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc , 4X30 mL). Έτσι, όλα τα σάκχαρα παρέμειναν στην υδατική φάση. Στη συνέχεια, τα συνθετικά οργανικά στρώματα (οργανικές φάσεις) ξηράθηκαν πάνω από άνυδρο

θεικό μαγνήσιο και εξατμίστηκαν υπό κενό [Apostolou Anna et al., 2013]. Τέλος, το στερεό διαλύθηκε σε DMSO 100% και στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH 6,8 (πεχαμετρικό χαρτί) με διάλυμα 0,1M NaOH. (Για να αποφευχθεί η αποικοδόμηση των πολυφαινόλων, όλες οι προαναφερθείσες διαδικασίες εκτελέστηκαν απουσία ηλιακού φωτός και σε θερμοκρασίες κάτω των 35 °C).

Παραπροϊόντα χυμοποίησης ροδιού:

Για να δώσει ο καρπός υψηλής ποιότητας χυμό θα πρέπει να συλλεχθεί στο κατάλληλο στάδιο ωρίμανσης. Η συγκομιδή των καρπών γίνεται είτε μηχανικά είτε χειρονακτικά. Σε επόμενο στάδιο οι καρποί ελέγχονται και πλένονται εξωτερικά με νερό ή άλλα απολυμαντικά μέσα. Στη συνέχεια οδηγούνται προς αποσπύρωση-αποφλοιώση (παραπροϊόν→ φλοιός), εκχύμωση (σύνθλιψη ολόκληρου του καρπού ή συμπίεσή του αφού κοπεί στα δύο) όπου συνήθως απομονώνονται τα αρίλια και στη συνέχεια συμπιέζονται ή φυγοκεντρούνται περισσότερες από μία φορές (καθίζηση). Η συμπίεση πρέπει να γίνει με προσοχή ώστε να μην περάσουν στο χυμό ανεπιθύμητες ουσίες ή σπόρια. Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιείται φίλτρανση και διαύγαση των προϊόντων καθώς διάφορα σωματίδια του φυτού και μη διαλυτά συστατικά όπως ίνες, άμυλο και πολυφαινόλες το καθιστούν θολό. Τέλος, ο χυμός μπορεί να παστεριωθεί και συνήθως αυτό γίνεται με θέρμανση [Nagi et al. 1993].



Εικόνα 30: Διαδικασία παραγωγής εκχυλισμάτων ροδιού

2.7 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετά από διόρθωση (ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης της α-D- Glc-1-P και της παρουσίας

φωσφορικών στο ενζυμικό μείγμα) μετατρέπονται σε μmol φωσφορικών σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m , mol) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten,

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

V : ταχύτητα

V_{\max} : μέγιστη ταχύτητα

$[S]$: συγκέντρωση υποστρώματος

K_m : σταθερά Michaelis-Menten.

Τέλος, γίνεται η καμπύλη $V=f([S])$, η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ του V_{\max} . Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC_{50} , οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα.

3.Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb

Προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι θα πρέπει στο διάλυμα του ενζύμου να μην υπάρχει AMP. Για τον λόγο αυτό ακολουθείται διαδικασία για την απομάκρυνση του.

Το διάλυμα του ενζύμου υφίσταται διαπίδυση έναντι διαλύματος 10 mM BES (pH 6.7) για περίπου 16h. Στη συνέχεια πραγματοποιείται κατεργασία με ενεργό ζωάνθρακα ώστε να απομακρυνθούν τα νουκλεοτίδια. Στη συνέχεια, μετρείται η οπτική απορρόφηση του ενζυμικού διαλύματος σε μήκη κύματος 260nm και 280nm. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων (A_{260}/A_{280}) πρέπει να είναι <0.53 .

Η κρυστάλλωση στηρίζεται στην αργή, ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης υπό συνθήκες που δεν την μετουσιώνουν. Έτσι δίδεται χρόνος στην πρωτεΐνη να οργανωθεί σε κρυστάλλους και όχι σε άμορφο ίζημα. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (T state) γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο batch [Oikonomakos et al., 1985]. Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και

στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας απότομα κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στην περίπτωση της ανάπτυξης κρυστάλλων GPb (T state), η πρωτεΐνη ως εναιώρημα σε κατάλληλες συνθήκες αναπτύσσεται σε τετραγωνικούς κρυστάλλους (ομάδας χώρου $P4_32_12$) εντός γυάλινων σωλήνων.

ΥΛΙΚΑ:

Ρυθμιστικό διάλυμα BES, σουλφονικό άλας του N,N-δισ(2-υδροξυαιθυλο)-2-αμινοαιθανίου(10mM BES, 1mM EDTA 2% NaN₃, 2 mM DTT pH 6.7)

Διάλυμα DTT 200mM, pH 6.7

Διάλυμα σπερμίνης 200mM, pH 6.7

Διάλυμα IMP 100mM, pH 6.7

Πυρήνες κρυστάλλωσης

Εναιώρημα GPb περιεκτικότητας 20-30 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα BES.

Γυάλινοι σωλήνες διαμέτρου 2-3nm, μήκους 3 cm.

ΟΡΓΑΝΑ:

Φασματοφωτόμετρο UV

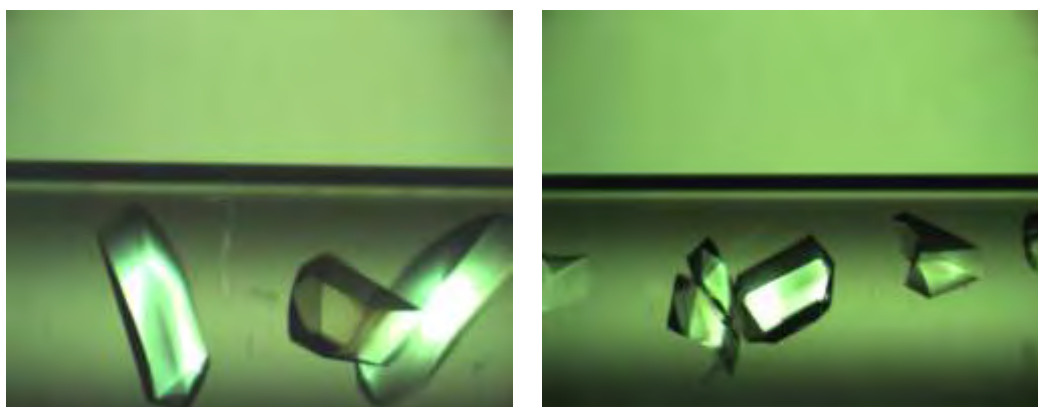
ΠΟΡΕΙΑ:

Για την ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων (ομάδας συμμετρίας χώρου $P4_32_12$) της GP χρησιμοποιείται η στατική μέθοδος (batch method). Το ένζυμο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από AMP ($A_{260}/A_{280} = 0.53$). Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι.. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε μικρούς σωλήνες μήκους περίπου 3cm και εσωτερικής διαμέτρου 2-3mm, των οποίων τα δύο άκρα κλείνονται με parafilm.

Οι κρύσταλλοι της φυσικής T διαμόρφωσης της GPb αναπτύσσονται από μίγμα 20-30 mg/ml καθαρής πρωτεΐνης, 1 mM σπερμίνης, 3 mM DTT, 10 mM BES/HCl (pH 6.7), 0.1 mM EDTA και 0.02% (w/v) NaN₃ στο οποίο προστίθεται διάλυμα πυρήνων

κρυστάλλωσης κατάλληλης αραιώσης [Oikonomakos *et al.*, 1985]. Ο σχηματισμός των κρυστάλλων αρχίζει σε 5-6 h στους 16°C, ενώ η ανάπτυξη συνεχίζεται για μερικές εβδομάδες. Οι διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας των κρυστάλλων είναι $a=b=128.6 \text{ \AA}$, $c=116.1 \text{ \AA}$ και $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$.

Οι κρύσταλλοι αυτοί είναι ισόμορφοι με τους κρυστάλλους που αναπτύσσονται παρουσία οξικού μαγνησίου αντί σπερμίνης. Συνήθως το μέγεθος αυτών είναι 0.2-0.5mm, κατάλληλο για την περαιτέρω χρήση αυτών σε πειράματα περίθλαση



ακτινών-X. Η σχέση που συνδέει την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας με το μέγεθος του κρυστάλλου είναι: $I = I_0 * e^{-\mu t}$

Εικόνα 31. Τετραγωνικοί κρύσταλλοι της GPb στην T διαμόρφωση.

4. Σχηματισμός συμπλόκου κρυστάλλου-αναστολέα για κρυσταλλογραφική μελέτη.

ΥΛΙΚΑ:

Διάλυμα αναστολέα

Κρύσταλλοι GPb

Ρυθμιστικό διάλυμα BES (10mM BES, 1mM EDTA 2% NaN₃, 2 mM DTT pH 6.7)

Τριχοειδείς σωλήνες (διαμέτρου 1.0, 2.0 mm)

Κερί

Σύριγγες

ΟΡΓΑΝΑ:

Στερεοσκόπιο

Πιπέτες Pasteur

Η κρυσταλλογραφική μελέτη των εν δυνάμει αναστολέων έχει σαν σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου δράσης των ενώσεων που υπέδειξαν τα κινητικά πειράματα.

Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο-αναστολέας πραγματοποιείται είτε με τη μέθοδο της συγκρυστάλλωσης είτε με τη μέθοδο του εμποτισμού προσχηματισμένων κρυστάλλων του ενζύμου με διάλυμα αναστολέα, όπου η ουσία διαχέεται εντός των καναλιών του κρυστάλλου και συνδέεται στην πρωτεΐνη, στο κέντρο σύνδεσης για το οποίο παρουσιάζει συγγένεια. Στην περίπτωση όπου το σύμπλοκο σχηματίζεται με τη μέθοδο του εμποτισμού ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες θα γίνει η συλλογή δεδομένων (κρυογενείς συνθήκες ή σε θερμοκρασία δωματίου) ακολουθείται διαφορετική διαδικασία. Οι κρύσταλλοι αρχικά μεταφέρονται σε διάλυμα BES εντός τριβλίου Petri. Στη συνέχεια, επιλέγονται μεμονωμένοι κρύσταλλοι οι οποίοι δεν φέρουν ορατές προσμίξεις ή άλλες εναποθέσεις μικροκρυστάλλων στην επιφάνειά τους οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν για τη συλλογή δεδομένων.

Στην περίπτωση συλλογής σε θερμοκρασία δωματίου οι κρύσταλλοι μεταφέρονται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur μέσα σε μικρούς τριχοειδείς σωλήνες και το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο τον περιβάλλει απομακρύνεται με χρήση μικρών λωρίδων απορροφητικού χαρτιού για να αντικατασταθεί από το διάλυμα του αναστολέα που θα μελετηθεί. Το διάλυμα του αναστολέα προστίθεται στον σωλήνα και αφήνεται για ικανό χρονικό διάστημα ώστε να εμποτίσει τον κρύσταλλο (π.χ. ~2-3 hrs). Στη συνέχεια το διάλυμα απομακρύνεται από το σωλήνα και στα δύο του άκρα τοποθετείται μικρή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος BES (για την αποφυγή αφυδάτωσης του κρυστάλλου). Τέλος ο τριχοειδής σωλήνας σφραγίζεται και στα δύο του άκρα με τη χρήση μικρής ποσότητας κεριού και τοποθετείται στο γωνιόμετρο για την έκθεση του στη δέσμη ακτίνων X.

5. Έκθεση πρωτεϊνικού μονοκρυστάλλου σε ακτίνες X

Η έκθεση μονοκρυστάλλου πρωτεΐνης σε ακτίνες-X έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων των ατόμων, που αποτελούν την πρωτεΐνη, με την ακτινοβολία και την ελευθέρωση δευτερογενούς ακτινοβολίας. Η ένταση της περιθλώμενης αυτής ακτινοβολίας μπορεί να μετρηθεί με ειδικούς ανιχνευτές και να γίνει συλλογή περιθλασιγραμμάτων. Τα περιθλασιγράμματα αυτά αποτελούν τα πειραματικά δεδομένα, από τα οποία, μετά από κατάλληλη επεξεργασία και

συγχώνευσή αυτών με ειδικό λογισμικό για κρυσταλλογραφικές μελέτες, υπολογίζεται η ηλεκτρονιακή πυκνότητα της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου.

Υλικά:

Μονοκρύσταλλος

Όργανα:

Πηγή ακτινών-X

Ανιχνευτής πεδιάς

Γωνιόμετρο

Πορεία:

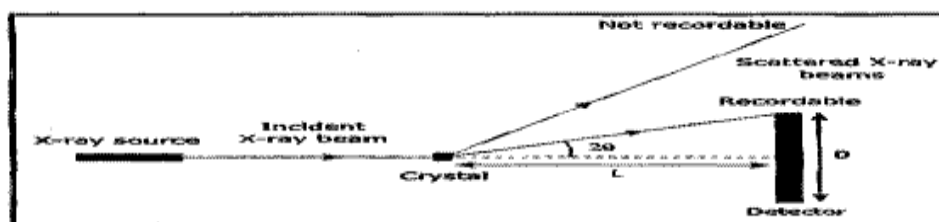
Ο κρύσταλλος που βρίσκεται στον τριχοειδή σωλήνα τοποθετείται στο γωνιόμετρο και στη συνέχεια το όλο σύστημα τοποθετείται στην κατάλληλη υποδοχή ανάμεσα στον ανιχνευτή και την έξοδο της ακτινοβολίας. Ο κρύσταλλος ευθυγραμμίζεται ως προς την διεύθυνση της δέσμης της ακτινοβολίας με ρυθμίσεις του γωνιομέτρου.



Εικόνα 32. Τριχοειδής σωλήνας τοποθετημένος στο γωνιόμετρο.

Με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού καταχωρούνται όλα τα χαρακτηριστικά του πειράματος: μήκος κύματος ακτινοβολίας (λ), απόσταση ανιχνευτή-κρυστάλλου (d), χρόνος έκθεσης (t), γωνία περιστροφής και αριθμός εικόνων. Ο καθορισμός της απόστασης κρυστάλλου-ανιχνευτή γίνεται σύμφωνα με το νόμο του Bragg και δεδομένων της διαμέτρου του ανιχνευτή, του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και

της επιθυμητής μέγιστης ευκρίνειας. Στην εικόνα 32 παρουσιάζονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της διάταξης του πειράματος περίθλασης ακτίνων X.



Εικόνα 33. Γεωμετρικά χαρακτηριστικά πειραματικής διάταξης περίθλασης ακτίνων-X. Η πηγή ακτίνων X εκπέμπει ακτινοβολία η οποία και προσπίπτει στον κρύσταλλο. Σύμφωνα με το νόμο του Bragg, η ακτινοβολία περιθλάται υπό γωνία 2θ και μετράται από ανιχνευτή που βρίσκεται σε απόσταση L από το κρύσταλλο. Σύμφωνα με τη διάταξη γίνεται καταγραφή μόνο των ανακλάσεων που πληρούν τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του τριγώνου: κρύσταλλος-κέντρο ανιχνευτή-άκρο ανιχνευτή. Από τον νόμο του Bragg καθορίζεται η γωνία θ (2θ αποτελεί η γωνία μεταξύ του επιπέδου διάδοσης της ακτίνας και της ανακλώμενης ακτίνας), από τη διάταξη η απόσταση L , έτσι ώστε να έχουμε την επιθυμητή ευκρίνεια [Rhodes, 1993].

Στη συνέχεια ακολουθεί η έκθεση του κρυστάλλου και η λήψη των περιθλασιγραμμάτων. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο Max-Lab του Lund University στην Σουηδία. Ταυτόχρονα γίνεται και η αρχική επεξεργασία τους με το πρόγραμμα HKL, όπου η κάθε εικόνα επεξεργάζεται ξεχωριστά (ταξινόμηση κηλίδων) και στη συνέχεια οι εικόνες συγχωνεύονται. Η συγχώνευση μας δίνει την πληρότητα αλλά και τη ποιότητα των δεδομένων.

6. Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

Η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων αποτελεί κυρίως τον υπολογισμό των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $2Fo-Fc$, $Fo-Fc$ (Fo : ηλεκτρονιακή πυκνότητα που προκύπτει από πειραματικούς δομικούς παράγοντες, Fc : ηλεκτρονιακή πυκνότητα που προκύπτει από θεωρητικούς δομικούς παράγοντες του μοντέλου), την βελτιστοποίηση του αρχικού μοντέλου της δομής της πρωτεΐνης με κύκλους βελτιστοποίησης (ακολουθώντας το πρωτόκολλο που υπαγορεύεται από το REFMAC)

7. Κρυσταλλογραφική μελέτη του εκχυλίσματος 7 (ποικιλίας Wonderful).

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε κρυσταλλογραφική μελέτη της σύνδεσης στη φωσφορυλάση b του πολυφαινολικού εκχυλίσματος 7 από παραπροϊόντα της βιομηχανικής παραγωγής χυμού από το φυτό ροδιά (*Punica Granatum*) της ποικιλίας Wonderful. Τα επί μέρους στάδια της μελέτης είναι τα εξής:

Εμποτισμός μονοκρυστάλλου GPb (διαμόρφωση T) με διάλυμα του αναστολέα και συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων X

Κρύσταλλος φωσφορυλάσης γλυκογόνου b, που είχε αναπτυχθεί με τη μέθοδο batch (βλ. Πειραματικό μέρος, §3) εμβαπτίστηκε (βλ. Πειραματικό μέρος, §4) σε διάλυμα αναστολέα που είχε αραιωθεί σε τελική συγκέντρωση 10mg/ml, 15% DMSO με 10 mM BES pH 6.7 και έπειτα επώαστηκε για 18h. Ακολούθησε η τοποθέτηση του κρυστάλλου στη διάταξη του με τέτοιο τρόπο ώστε κατά την περιστροφή του να παραμένει στη δέσμη της ακτινοβολίας.

Βελτιστοποίηση του μοντέλου

Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ως αρχικό μοντέλο τη δομή της T διαμόρφωσης της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου όπως παρουσιάζεται στο σύμπλοκο του ενζύμου με την α-D-γλυκόζη με τη βοήθεια του προγράμματος REFMAC (CCP4, 1994). Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται είναι οι ατομικές συντεταγμένες, οι συντελεστές θερμοκρασίας και οι συντελεστές κατάληψης (occupancies). Οι στερεοχημικοί περιορισμοί που λαμβάνονται υπόψη για την ελαχιστοποίηση της τιμής της ελεύθερης ενέργειας αυξάνουν το λόγο των παρατηρήσεων προς τον αριθμό των παραμέτρων. Τα επιπρόσθετα αυτά δεδομένα προέρχονται από τη γνώση της στερεοχημείας των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα τα μήκη και οι γωνίες των δεσμών μεταξύ των ατόμων, πληροφορίες που είναι γνωστές από τις ακριβείς δομές των αμινοξέων.

Ένα μέρος των δεδομένων περίθλασης (5-10%) επιλέγεται τυχαία πριν από τη διαδικασία βελτιστοποίησης με σκοπό να υπολογιστεί ο αρχικός δείκτης αξιοπιστίας R, ο οποίος στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί ως ανεξάρτητο κριτήριο της προόδου της βελτιστοποίησης [Brunger, 1992].

Στατιστικά στοιχεία συλλογής κρυσταλλογραφικών δεδομένων του συμπλόκου GPb- Εκχυλίσματος ροδιού

Πείραμα	Κρύσταλλοι GPb T διαμόρφωσης διαποτίζονται με διάλυμα 10mg/ml για 18h
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας MAX-Lab, Lund, Σουηδία	ID911-2
Μήκος κύματος, λ (Å)	1.0402
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.8
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων	70
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P4 ₃ 2 ₁ 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας a, b, c (Å)	128.9, 128.9, 116.5
Αριθμός μορίων/Ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	2.15
Αριθμός περιθλάσεων	242483
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (Εξώτ. στοιβάδα)	50751 (3660)
R _{merge} (Εξωτερική στοιβάδα)*	0.111 (0.471)
Πληρότητα (Εξωτερική στοιβάδα) (%)	99.5 (99.7)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	2.27-2.15
< I / σ(I) > (Εξωτερική στοιβάδα)**	9.7 (3.7)
Πολλαπλότητα (Εξωτερική στοιβάδα)	4.5 (4.4)
Τιμή συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (Wilson plot)	30.4

Πίνακας 5

*Ο συντελεστής R_{merge} ορίζεται ως $R_m = \sum_i \sum_h |(I_h) - I_{ih}| / \sum_i \sum_h I_{ih}$, όπου (I_h) και I_{ih} είναι η μέση και η i-οστή μέτρηση της έντασης για την περιθλάση h, αντίστοιχα R_{iso} είναι η μέση κλασματική ισόμορφος διαφορά των ευρών των δομικών παραγόντων από τη φυσική GPb, T διαμόρφωσης.

**σ(I) είναι η τυπική απόκλιση του I.

Ακολούθησαν πολλαπλοί κύκλοι διόρθωσης του μοντέλου με το πρόγραμμα COOT [Paul Emsley & Kevin Cowtan, 2004] και βελτιστοποίησης με το REFMAC. Τα μόρια του ύδατος προστέθηκαν στο μοντέλο εφόσον είχαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος, και εντοπίζονταν στον ηλεκτρονικό χάρτη 2Fo-Fc. Τα μόρια των αναστολέων συμπεριλήφθηκαν επίσης στα τελικά στάδια της διαδικασίας της βελτιστοποίησης (refinement) και τα αρχικά τους μοντέλα προήλθαν από την βιβλιοθήκη του COOT. Τέλος, η βελτιστοποίηση των ισοτροπικών παραγόντων θερμοκρασίας των ατόμων βελτίωσε αισθητά το τελικό μοντέλο.

Υπολογισμός του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας διαφοράς Fo-Fc και 2Fo-Fc, στο πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης έδειξε πρόσθετη ηλεκτρονική πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Ακολούθησε διαδοχική βελτιστοποίηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα) στους νέους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας που υπολογίστηκαν, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, διεδρες γωνίες, κ.ά.) με το πακέτο προγραμμάτων CCP4. Αρχικά έγινε βελτιστοποίηση ατομικών συντεταγμένων (positional refinement) και ακολούθησε βελτιστοποίηση του ατομικού ισοτροπικού συντελεστή θερμοκρασίας B (B factor). Μόρια ύδατος προστέθηκαν στη δομή στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης λαμβάνοντας υπόψη τους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας Fo-Fc και 2Fo-Fc. Το τελικό μοντέλο περιείχε τα αμινοξέα 12-836, 86 μόρια νερού, τον αναστολέα και την φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). Οι δείκτες αξιοπιστίας από την τελευταία βελτιστοποίηση καθώς και η γεωμετρία του τελικού μοντέλου συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Παρουσίαση στατιστικών χαρακτηριστικών του τελικού μοντέλου GPb-εκχυλίσματος ροδιού	
Βελτιστοποίηση (Ευκρίνεια) (Å)	23.9 - 2.15
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (παραλείπονται) κατά την βελτιστοποίηση [#]	48032 (2719)
Αμινοξέα που περιελήφθησαν	12-254, 262-314, 324-836
Αριθμός πρωτεϊνικών ατόμων	6591
Αριθμός μορίων ύδατος	86
Αριθμός ατόμων υποκαταστατών	60
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας $R (R_{free})^*$ (%)	17.0 (20.3)
$R (R_{free})$ (Εξωτερική στοιβάδα) (%)	21.8 (27.5)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) του μήκους δεσμών (Å)	0.010
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) της γωνίας των δεσμών (°)	1.36
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (Πρωτεϊνικά άτομα)	
Όλα τα άτομα	30.9
Ca, C, N, O	28.3
Πλευρική αλυσίδα	33.4
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (ετεροάτομα)	
Μόρια ύδατος	25.5
Γαλλικό οξύ	29.9

Πίνακας 6

* Ο δείκτης αξιοπιστίας R ορίζεται ως $R = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum F_o}$, όπου F_o και $|F_c|$ είναι τα παρατηρούμενα και τα υπολογιζόμενα εύρη των δομικών παραγόντων, αντίστοιχα.

[#] Ποσοστό 5% επί του συνόλου των περιθλάσεων που χρησιμοποιείται κατά τη βελτιστοποίηση. Χρησιμεύει για την πιστοποίηση της ορθής εξέλιξης της βελτιστοποίησης.

Η δομή του συμπλόκου GPb – εκχυλίσματος ροδιού χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των εν δυνάμει δεσμών υδρογόνου και δυνάμεων van der Waals που μπορεί να σχηματίζει ο αναστολέας με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Χρησιμοποιήθηκε το πακέτο προγραμμάτων CCP4 με όριο απόστασης 3.3 Å για τους δεσμούς υδρογόνου και 4.0 Å για τις αλληλεπιδράσεις van der Waals. Τέλος

χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα γραφικών PyMol για την μοριακή απεικόνιση τρισδιάστατων μακρομοριακών μορίων.

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η αύξηση αριθμού των ασθενών που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2 έχει οδηγήσει στην ανάγκη για εκτεταμένη έρευνα με στόχο το σχεδιασμό νέων εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Τα φάρμακα αυτά έχουν στόχο ένζυμα και υποδοχείς που συμμετέχουν στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και αποσκοπούν σε μία πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2 [Kurukulasuriya et al, 2003].

Το ήπαρ είναι ένα όργανο που έχει ως σκοπό να αποκαθιστά της ενεργειακές ανάγκες των άλλων ιστών. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (LGP, Liver GP), ένζυμο υπεύθυνο για την κινητοποίηση του γλυκογόνου στο ήπαρ, αποτελεί έναν από τους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η αναστολή του ενζύμου αυτού έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της κινητοποίησης του γλυκογόνου και τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των ασθενών. Η φωσφορυλάση και η γλυκοκινάση αποτελούν δύο ένζυμα που φαίνεται να έχουν κατά κύριο λόγο τον έλεγχο της ρύθμισης της γλυκόζης που απελευθερώνεται από τα ηπατικά κύτταρα [Agius et al., 2001].

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας με στόχο τη μελέτη του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου για την κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από το ένζυμο και το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η εφαρμογή μεθόδων πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας για την ανάλυση της 3D δομής συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, σε υψηλή ευκρίνεια, μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό ενώσεων υψηλής συγγενείας και ρυθμιστικής ικανότητας στην ισορροπία αποικοδόμησης \Leftrightarrow σύνθεσης γλυκογόνου στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Ο σχεδιασμός με βάση τη μακρομοριακή δομή, η σύνθεση, η βιοχημική και βιολογική μελέτη της ουσίας αποτελεί σήμερα μία πορεία εργασιών με στόχο την ανακάλυψη ουσιών με δύο κυρίως χαρακτηριστικά: υψηλή εκλεκτικότητα και μεγάλη συγγένεια για την πρωτεΐνη-στόχο.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε αρχικά η κινητική μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού και αμπέλου για τον προσδιορισμό της IC₅₀ έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου και στη συνέχεια προσδιορίστηκε

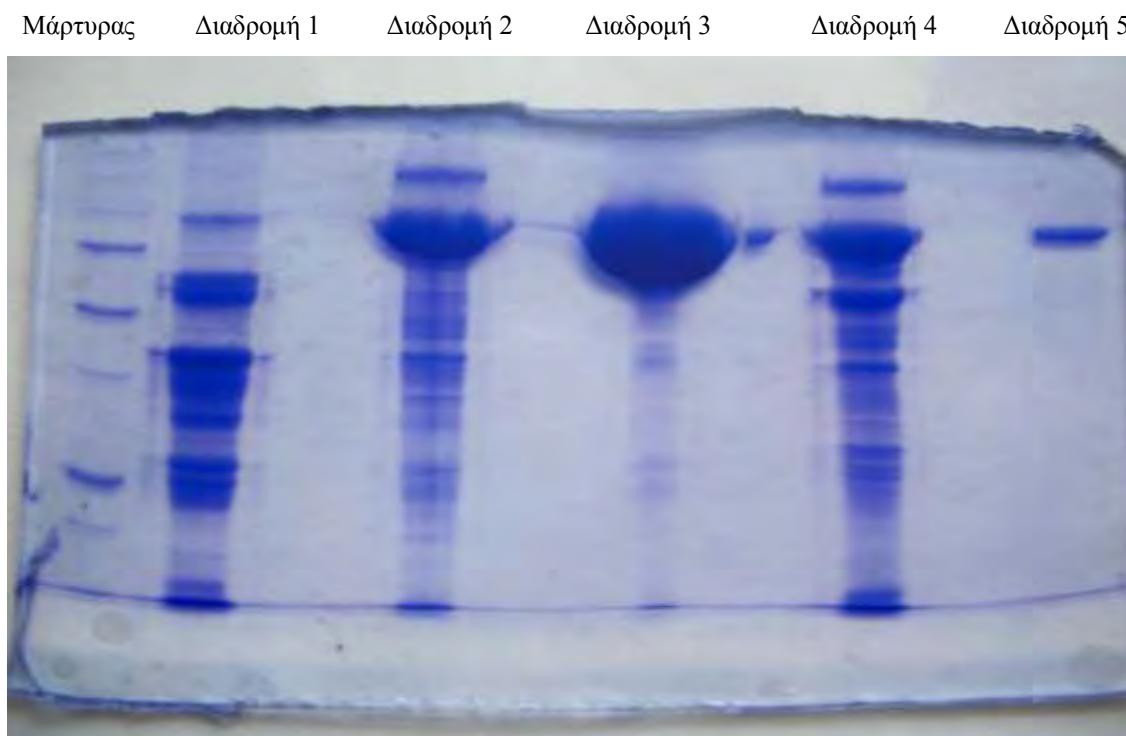
κρυσταλλογραφικά η δομή του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα (εκχυλίσματος ροδιού) προκειμένου να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής του ενζύμου

Παρόλο που ο πρωταρχικός στόχος είναι η ηπατική GP, το κρυσταλλογραφικό πρότυπο στο οποίο στηρίζεται ο σχεδιασμός ενώσεων στην παρούσα διατριβή είναι η μυϊκή GP. Η ηπατική GP είναι 80 % ομόλογη (ως προς την αμινοξική ακολουθία) με την μυϊκή GP, όμως η ομολογία μεταξύ των δυο ενζύμων είναι 100% στην περιοχή του ενεργού κέντρου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1.Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση b του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μυς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος (παράγραφος 1).



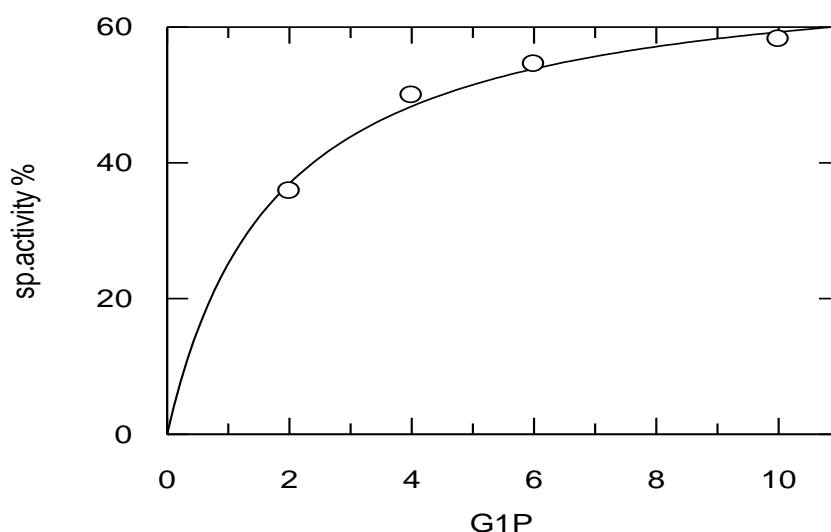
Εικόνα 34. Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH . Στην πέμπτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

2.Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

2.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου

Η σταθερά K_m (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (Glc-1-P για το ένζυμο GPb) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η K_m ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}). Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 2.5mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της K_m .(βλ. Πειραματικό μέρος, §2.2)

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m=1.78 \pm 0.27$ mM και $V_{max}=69,81 \pm 2,86$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Στην εικόνα παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity, μmol φωσφορικών / min/mg ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (G-1-P).



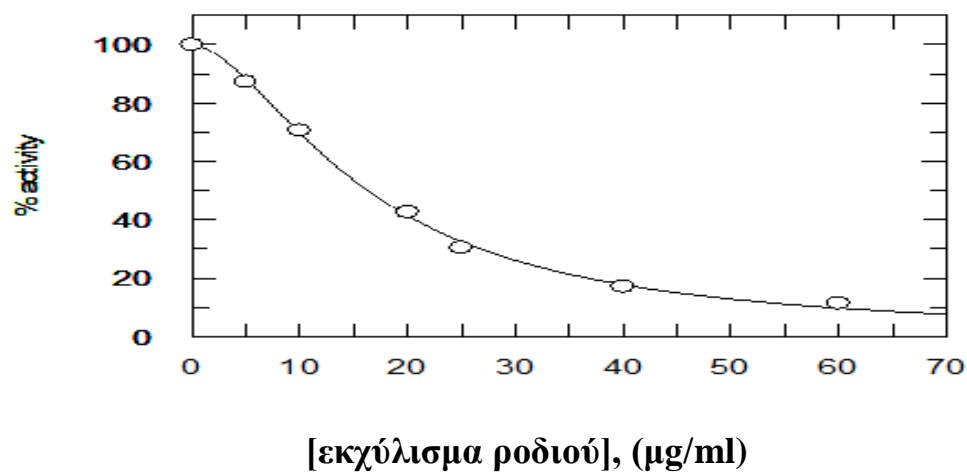
Εικόνα 35. Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

2.2 Κινητική μελέτη εκχυλισμάτων παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού και παραπροϊόντων αμπελοκομίας

Για το σκοπό της εργασίας, μετά την απομόνωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου μελετήθηκαν πολυφαινολικά εκχυλίσματα παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού και παραπροϊόντων αμπελοκομίας ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. Ακολουθούν τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων και οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν από το πρόγραμμα Graffit (Πίνακας 7) [Leatherberrow,1997].

Όνομα	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν	IC ₅₀ (μg/mL)
Εκχύλισμα χυμοποίησης ροδιού No 7	5μM, 10μM, 20μM, 25μM, 40μM, 60μM	16,31 ± 0,33
Μαυροτράγανο γίγαρτα 2011 (seeds)	0,5μM, 2μM, 5μM, 8μM	2,00 ± 0,02
Βοηδόματο βόστρυχοι 2006 (bunches)	2μM, 4μM, 5μM, 6μM, 7μM	5,08 ± 0,11
Ασσύρτικο Σαντορίνη 2008	2μM, 5μM, 8μM, 10μM, 20μM	5,13 ± 0,30
Ασσύρτικο Σαντορίνη στέμφυλα (marcs)	2μM, 5μM, 8μM, 10μM, 20μM	5,59 ± 0,19
Μαυροτράγανο βόστρυχοι (bunches)	2μM, 5μM, 6μM, 8μM, 10μM, 20μM	5,63 ± 0,57
Ασσύρτικο Σαντορίνη 2006	2μM, 5μM, 10μM, 15μM, 20μM	6,06 ± 0,48
Μοσχάτο	1μM, 4μM, 7μM, 8μM, 9μM, 15μM	9,74 ± 0,53

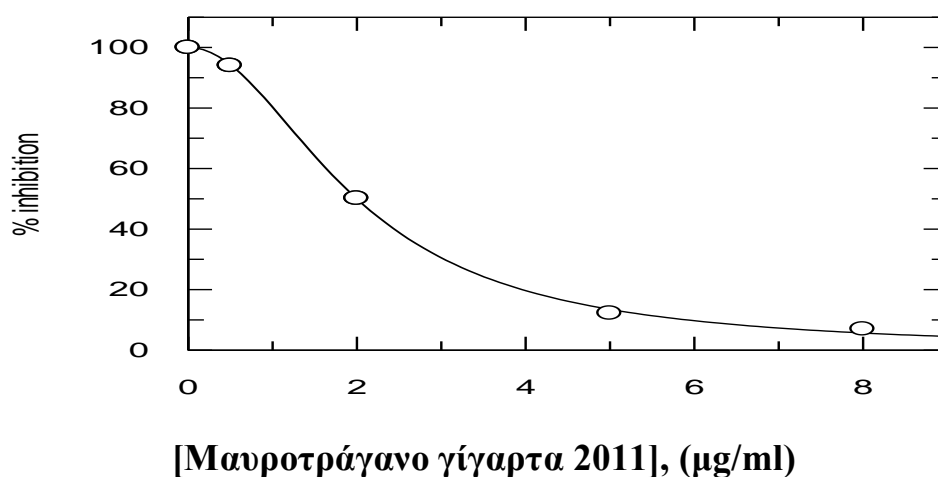
• Εκχύλισμα χυμοποίησης ροδιού No 7



Εικόνα 36. Καμπύλη της δραστηρότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και υπολογισμός της IC_{50} .

Parameter	Value	Std. Error
IC 50	16,31	0,33

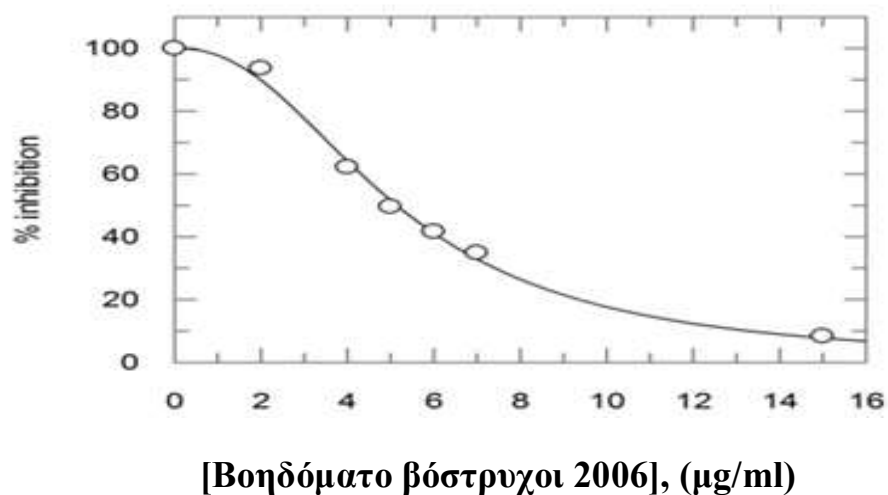
• Μαυροτράγανο γίγαρτα 2011 (seeds)



Εικόνα 37. Καμπύλη της δραστηρότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και υπολογισμός της IC_{50} .

Parameter	Value	Std. Error
IC 50	2,00	0,02

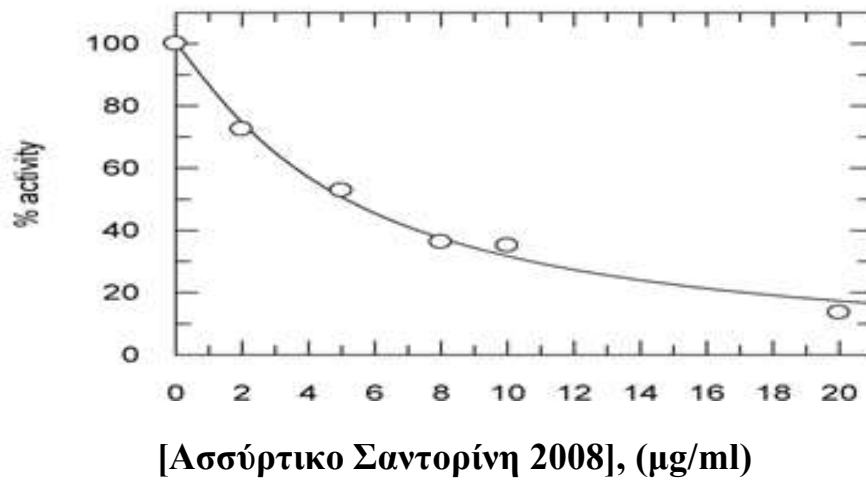
• Βοηδόματο βόστρυχοι 2006 (bunches)



Εικόνα 38. Καμπύλη της δραστικότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και υπολογισμός της IC₅₀.

Parameter	Value	Std. Error
IC 50	5,08	0,11

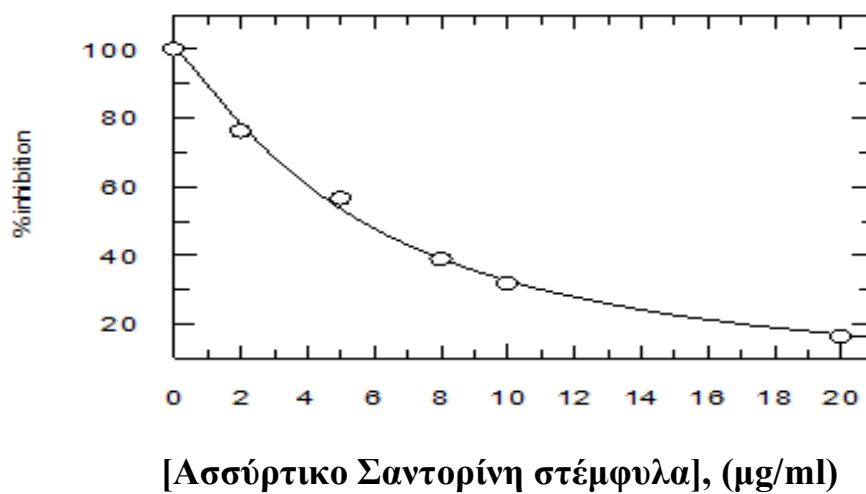
- Ασσύρτικο Σαντορίνη 2008



Εικόνα 39. Καμπύλη της δραστηριότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και υπολογισμός της IC₅₀.

Parameter	Value	Std. Error
IC 50	5,13	0,30

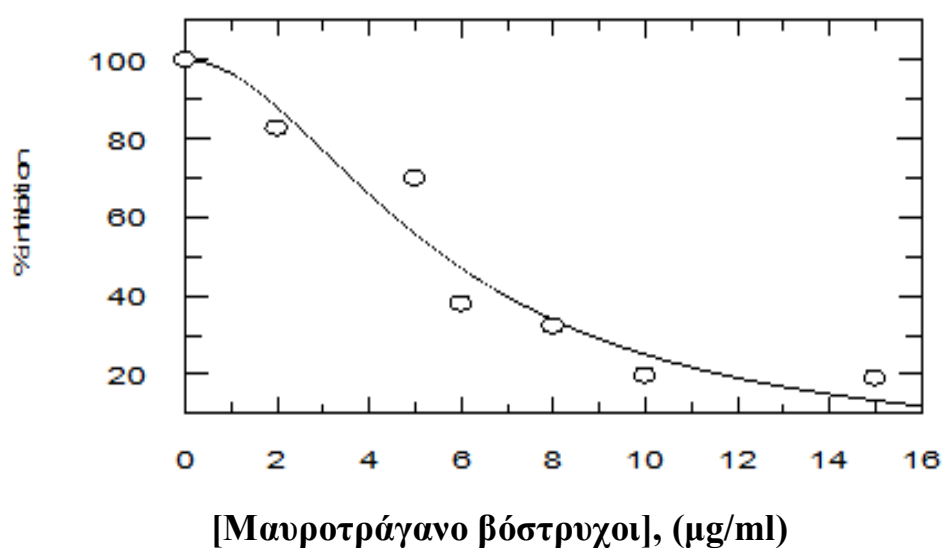
- Ασσύρτικο Σαντορίνη στέμφυλα (marcs)



Εικόνα 40. Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και υπολογισμός της IC_{50} .

Parameter	Value	Std. Error
IC 50	5,59	0,19

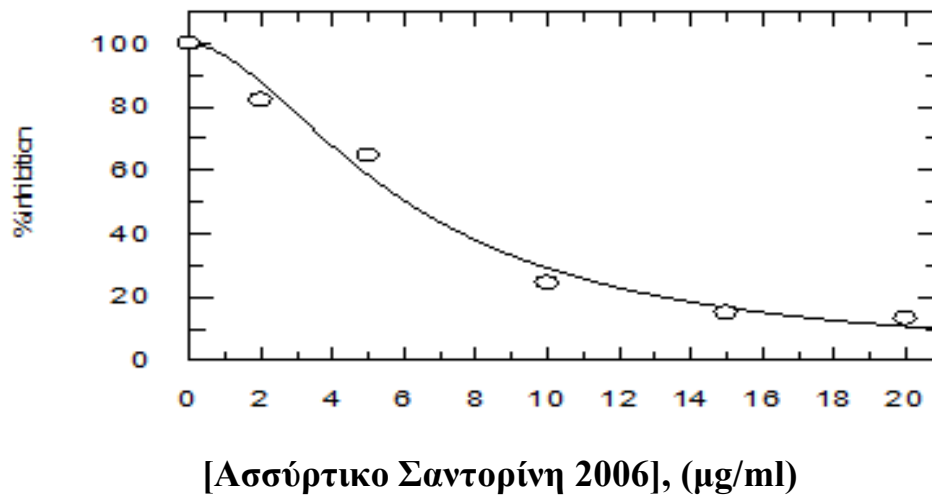
• **Μαυροτράγανο βόστρυχοι (bunches)**



Εικόνα 41. Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και υπολογισμός της IC_{50} .

Parameter	Value	Std. Error
IC 50	5,63	0,57

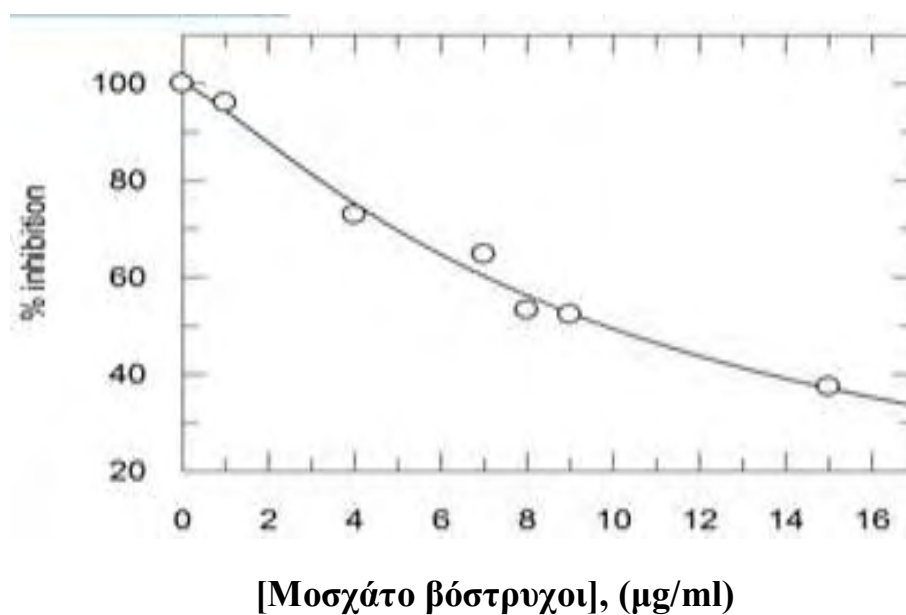
- Ασσύρτικο Σαντορίνη 2006



Εικόνα 42. Καμπύλη της δραστηριότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και υπολογισμός της IC_{50} .

Parameter	Value	Std. Error
IC 50	6,06	0,48

- Μοσχάτο βόστρυχοι (bunches)



Εικόνα 43. Καμπύλη της δραστηριότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και υπολογισμός της IC₅₀.

Parameter	Value	Std. Error
IC 50	9,74	0,53

Από ότι φαίνεται και από τον Πίνακα 7, το πλέον βιοδραστικό εκχύλισμα είναι το Μαυροτράγανο γίγαρτα 2011 αν και όλα τα εκχυλίσματα δείχνουν σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μιας και οι τιμές της IC₅₀ είναι μικρότερες του 10mg/ml. Κρυσταλλογραφικές μελέτες είναι σε εξέλιξη για την ταυτοποίηση της βιοδραστικής ουσίας των εκχυλισμάτων αυτών.

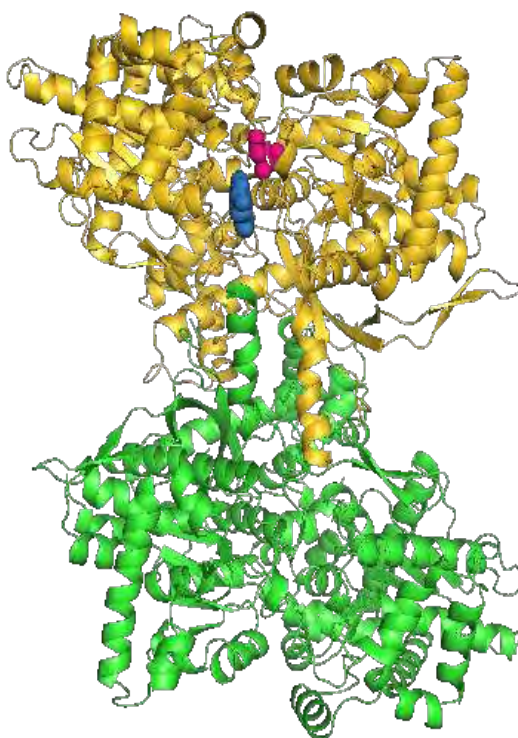
3. Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης

Η κρυσταλλογραφική μελέτη αποτέλεσε το επόμενο στάδιο της έρευνάς μας και είχε ως στόχο την ταυτοποίηση της βιοδραστικής ένωσης των εκχυλισμάτων, για την ερμηνεία των κινητικών αποτελεσμάτων. Η σύσταση των εκχυλισμάτων σε πολυφαινολικές ενώσεις παρουσιάζεται στον Πίνακα 8 για το εκχύλισμα παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού.

Μονομερείς Πολυφαινόλες	Συγκέντρωση Μονομερών Πολυφαινολών (mg/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)								
	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4	Δείγμα 5	Δείγμα 6	Δείγμα 7	Δείγμα 8	Δείγμα 9
Π-κουμαρικό οξύ - Ελλάγικό οξύ	98,37	298,98	167,74	253,08	238,52	434,90	189,82	269,04	494,12
Χλωρογενικό οξύ	48,99	49,25	48,76	47,69	48,43	48,11	47,73	47,86	47,67
Κατεχίνη	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΕ								
Κερκετίνη	33,61	37,25	35,76	34,42	40,53	36,91	34,24	35,58	34,67
Επικατεχίνη	65,41	38,21	36,38	47,99	58,42	66,65	58,24	40,74	42,96
Trans-ρεσβερατρόλη	44,94	44,99	44,76	44,77	44,79	45,47	44,94	45,15	45,77
Φλοριζίν (phloridzin)	36,94	40,78	33,59	32,98	33,84	34,19	33,30	32,58	33,32
Προκατεχικό οξύ	75,84	62,18	52,40	66,05	47,28	48,65	40,42	64,29	44,04
Γαλλικό οξύ	181,76	149,47	150,02	143,76	135,47	148,80	134,52	136,96	138,79
Καφεϊκό οξύ	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΕ								
Φερούλικό οξύ	45,96	46,93	45,89	45,84	48,63	46,15	45,91	45,61	46,20
Ρουτίνη	93,78	101,76	117,54	91,33	124,29	97,016	93,12	88,92	95,05

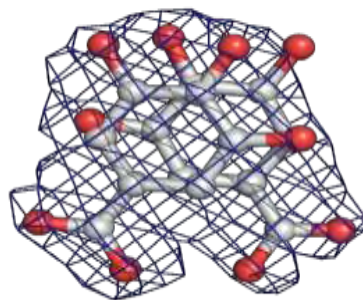
Πίνακας 8: Σύσταση σε πολυφαινολικές ενώσεις για τα εκχυλίσματα παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού.

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε περιελάμβανε την κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (διαμόρφωση T), τον εμποτισμό κρυστάλλου με διάλυμα της υπό μελέτη ουσίας (εκχυλίσματος χυμοποίησης ροδιού), τη συλλογή και την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Στη συνέχεια η δομή της GPb χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό μοντέλο το οποίο υποβλήθηκε σε βελτιστοποίηση έναντι των πειραματικών δεδομένων για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής του νέου συμπλόκου. Η ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων αποκάλυψε πως υπήρχαν μικρά μόρια συνδεδεμένα στο καταλυτικό κέντρο και στο κέντρο αναστολής του ενζύμου (Εικόνα 44).

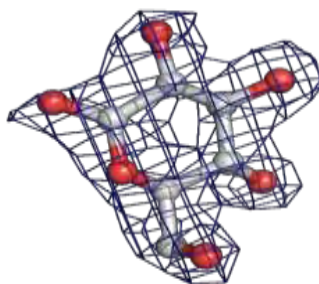


Εικόνα 44: Τα μόρια του γαλλικού οξέος και της γλυκόζης συνδεδεμένα στο καταλυτικό κέντρο (κόκκινο), και στο κέντρο αναστολής του ενζύμου (μπλε) στη βιολογικά ενεργή διμερή μορφή του ενζύμου.

Μελέτες μοντελοποίησης αποκάλυψαν πως η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο κέντρο αναστολής αντιστοιχεί σε ένα μόριο γαλλικού οξέος, το οποίο συνδέεται με δύο διαφορετικές διαμορφώσεις (Εικόνα 45), ενώ η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο σε ένα μόριο γλυκόζης (Εικόνα 46). Στη συνέχεια αναλύθηκαν οι μοριακές αλληλεπιδράσεις των αναστολέων με την πρωτεΐνη.

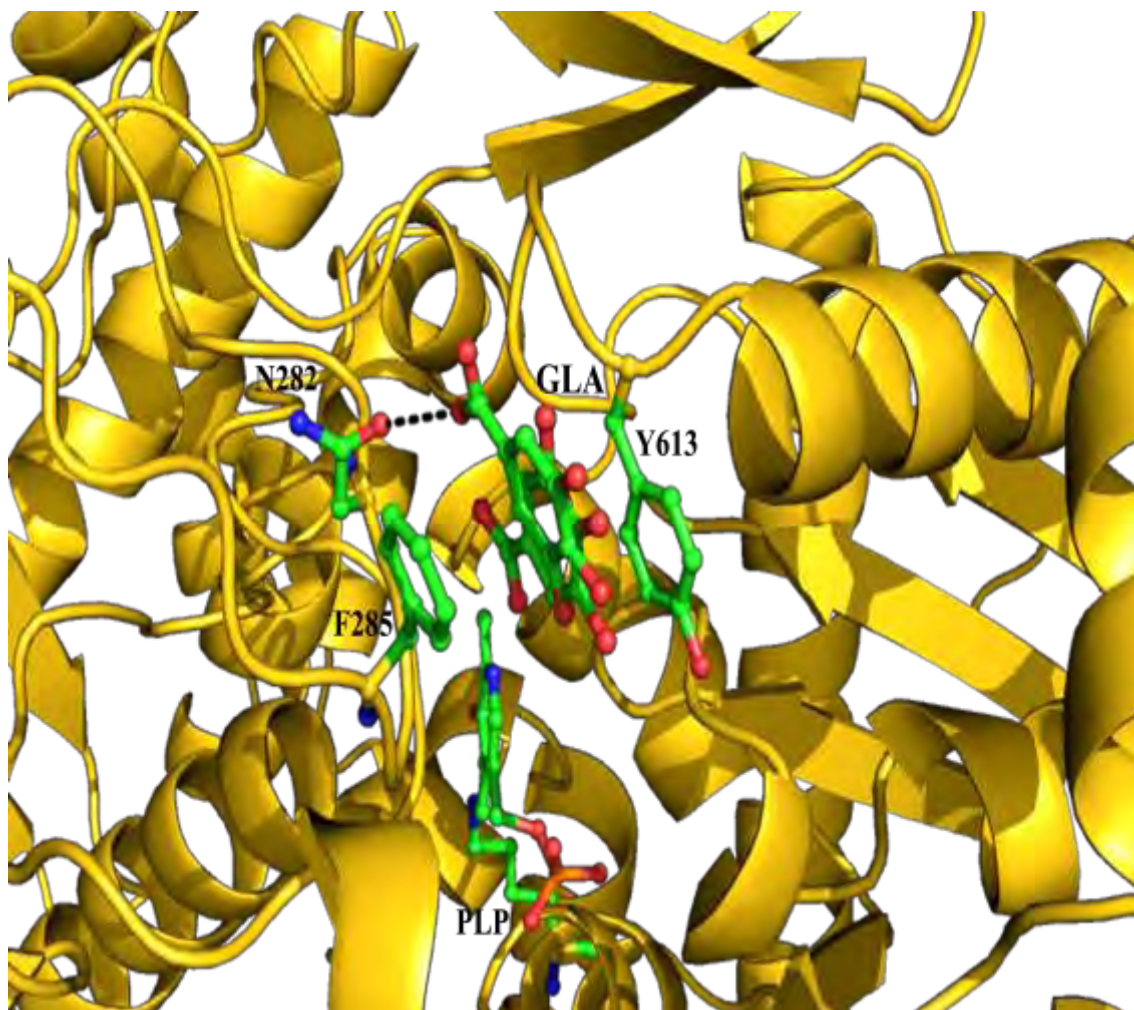


Εικόνα 45: Ηλεκτρονιακή πυκνότητα που αντιστοιχεί στο μόριο γαλλικού οξέος (προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο).



Εικόνα 46: Ηλεκτρονιακή πυκνότητα που αντιστοιχεί στο μόριο γλυκόζης (προσδένεται στο κέντρο πρόσδεσης του αναστολέα).

Είναι η πρώτη φορά που παρατηρείται η σύνδεση γαλλικού οξέος στο κέντρο αναστολής (Εικόνα 47) και από ότι φαίνεται η σύνδεσή του γίνεται κυρίως με αλληλεπιδράσεις van der Waals και αλληλεπιδράσεις επιστοίβαξης μεταξύ του φαινολικού δακτυλίου του αναστολέα και των πλευρικών αλυσίδων της Tyr613 και Phe285 (Εικόνα 47/ Πίνακες 9, 10, 11). Από τα κρυσταλλογραφικά πειράματα είναι έκδηλο πως η βιοδραστική ένωση του εκχυλισμάτος από τη βιομηχανική επεξεργασία του ροδιού είναι το γαλλικό οξύ. Φυσικά θα χρειαστούν περαιτέρω μελέτες για την επαλήθευση του αποτελέσματος με τη χρήση γαλλικού οξέος σε καθαρή μορφή.



Εικόνα 47: Σύνδεση γαλλικού οξέος στο κέντρο αναστολής. Με διακεκομμένες γραμμές αναπαριστάται ο δεσμός υδρογόνου, ενώ επίσης εμφανίζονται και οι πλευρικές αλυσίδες των Phe285 και Tyr613 με τις οποίες τα άτομα του γαλλικού συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις van der Waals.

Άτομο Αναστολέα	Άτομο πρωτεΐνης	Απόσταση(Å)	
		Glc	Gallic acid
O2	Tyr573 OH	3.08	-
	Glu672 OE1	3.27	-
	Wat86 O	2.82	-
O3	Gly675 N	3.05	-
	Glu672 OE1	2.73	-
	Ser674 N	3.02	-

O4	Gly675 CA Gly675 N Wat86 O	3.28 2.80 2.65	- - -
O6	His377 ND1 His377 CE1 Asn484 OD1	2.70 3.27 2.64	- - -
C5	Wat86 C	3.30	-
C6	Asn484 OD1	3.14	-
OAB[A]	Ala610 CB	-	3.19
OAB[O]	Asp282 OD1	-	2.93

Πίνακας 9: Πολικές αλληλεπιδράσεις του γαλλικού οξέος και της γλυκόζης με τα αμινοξικά κατάλοιπα της GPb κατά τη σύνδεση τους στα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου.

Άτομο Αναστολέα	Άτομο πρωτεΐνης	Απόσταση(Å)
		Glc
C1	His377 O	3.97
O1	Leu136 N Leu136 CB Asn284 ND2	3.61 3.92 3.31
C2	Glu672 OE1 His377 O Wat31 O	3.86 3.46 3.47
O2	Asn284 ND2 Asn284 OD1 Asn284 CG His377 O	3.41 3.48 3.83 3.96
C3	Gly675 N Gly675 OE1 Wat86 O	3.72 3.37 3.66
O3	Gly675 CA Ala673 CA Ala673 C Ser674 CA Ser674 C Glu672 CG Gly672 CD	3.94 3.87 3.92 3.83 3.81 3.70 3.55

	Gly672 C	3.91
	Ala673 N	3.34
	Ala673 CB	3.83
	Wat31 O	3.65
C4	Gly675 N	3.69
	Asn484 OD1	3.95
O4	Gly675 C	3.36
	Gly675 O	3.62
	Thr676 N	3.90
	Ser674 CA	3.99
	Ser674 CB	3.45
	Ser674 OG	3.99
	Ser674 C	3.80
	Asn484 OD1	3.44
C5	Gly135 CA	3.97
	Gly135 C	3.75
	Leu136 N	3.81
C6	Gly135 O	3.79
	Gly135 C	3.83
	His377 ND1	3.47
	His377 CE1	3.95
	Asn484 OD1	3.14
	Wat86 O	3.98
O6	Leu139 CD2	3.95
	Val455 CG2	3.94
	Val455 CG1	3.99
	Asn484 CG	3.70
	His377 CG	3.92
O5	Gly135 C	3.97
	His377 ND1	3.39
	Leu136 N	3.53
	Leu136 CA	3.82
	Leu136 CB	3.92
	His377 CB	3.81
	His377 CG	3.93

Πίνακας 10: Αλληλεπιδράσεις van der Waals της γλυκόζης με τα αμινοξικά κατάλοιπα της GPb κατά τη σύνδεση τους στα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου.

Άτομο Αναστολέα	Άτομο πρωτεΐνης	Απόσταση(Å)
		Gallic acid
CAL	Tyr613 CD1	3.75
	Phe285 CE1	3.79
	Phe285 CD1	3.91
	Phe285 CE1	3.49
	Phe285 CZ	3.92
CAI	Tyr613 CD1	3.96
	Tyr613 CA	3.96
	Tyr613 CB	3.99
	Phe285 CE1	3.97
	Phe285 CZ	3.92
	Tyr613 CG	3.83
	Tyr613 CD1	3.77
	Phe285 CG	3.85
	Phe285 CD1	3.40
	Phe286 CE1	3.48
CAF	Tyr613 CG	3.66
	Tyr613 CA	3.89
	Tyr613 CB	3.49
	Phe285 CG	3.93
	Phe285 CD2	3.90
	Phe285 CE2	3.99
	Tyr613 CG	3.83
	Tyr613 CB	3.84
	Phe285 CG	3.52
	Phe285 CD2	3.62
	Phe285 CD1	3.57
	Phe285 CE1	3.74
	Phe285 CZ	3.85
	Phe285 CE2	3.79
CAK	Tyr613 CG	3.45
	Tyr613 CD1	3.94
	Tyr613 CD2	3.51
	Tyr613 CB	3.73
	Phe285 CB	3.87
	Phe285 CG	3.54
	Phe285 CD2	3.97
	Phe285 CD1	3.62
	Phe285 CD2	3.72
	Phe285 CE1	3.98

	Phe285 CZ Phe285 CE2	3.61 3.46
CAH	Tyr613 CG Tyr613 CD2 Phe285 CB Phe285 CG Gly612 C Phe285 CD2 Phe285 CD2 Gly612 O	3.85 3.50 3.39 3.58 3.89 3.79 3.60 3.97
OAA	Asp283 O Tyr613CE2 Tyr613CE2 Phe285 CB Phe285 CG Gly612 CA Gly612 C Phe285 CE2 Gly612 O	3.56 3.70 3.46 3.41 3.98 3.78 3.68 3.96 3.61
OAB	Asn282 OD1 Phe285 CB Phe285 CG Phe285 CD2 Ala610 CB Phe285 CD2 Phe285 CE2	3.41 3.57 3.82 3.94 3.84 3.74 3.97
CAG	Tyr613 CG Tyr613 CD1 Tyr613 CE1 Tyr613 CZ Tyr613 CE2 Tyr613 CD2 Phe285 CG Phe285 CD1 Phe285 CE1 Phe285 CE1 Phe285 CZ Phe285 CE2 Gly612 O	3.68 3.76 3.82 3.78 3.68 3.62 3.86 3.47 3.95 3.99 3.54 3.80 3.95
CAJ	Tyr613 CD1 Tyr613 CD2 Tyr613 CZ Phe285 CD1 Phe285 CE1 Phe285 CE1 Phe285 CZ	3.66 3.63 3.97 3.77 3.78 3.76 3.70

OAD	Tyr613 CE1	3.73
	Tyr613 CZ	3.99

Πίνακας 11: Αλληλεπιδράσεις van der Waals του γαλλικού οξέος με τα αμινοξικά κατάλοιπα της GPb κατά τη σύνδεση τους στα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), μία από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές, εκδηλώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα δε διατηρούνται σταθερά. Με σκοπό τη θεραπεία της παθολογικής αυτής κατάστασης, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό ενώσεων που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για κάποιο κέντρο σύνδεσης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικά φάρμακα. Προς αυτήν την κατεύθυνση, το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από το ήπαρ αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία, απομονώσαμε το ένζυμο φωσφορυλάση b του γλυκογόνου (GPb) από σκελετικούς μυς κουνελιού και μελετήθηκε με κινητικά πειράματα η επίδραση εκχυλίσματος παραπροϊόντων βιομηχανικής παραγωγής χυμού ροδιού και οίνου στην ενζυμική του δραστηριότητα. Ειδικότερα, η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και έδειξε ότι οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50% (IC_{50}), σε σημαντικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Με στόχο την ανίχνευση του ενεργού συστατικού του εκχυλίσματος διεξήχθη κρυσταλλογραφική μελέτη με εμποτισμό κρυστάλλων της GPb με διάλυμα του εκχυλίσματος, η οποία απεκάλυψε πως το ενεργό συστατικό είναι το γαλλικό οξύ το οποίο συνδέεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Ανάλυση της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου GPb-εκχυλίσματος απεκάλυψε τη μοριακή βάση της αναστολής. Το γαλλικό οξύ κατά τη σύνδεση του στο κέντρο αναστολής της GPb σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου και συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις van der Waals με αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης. Η παρούσα μελέτη μπορεί να αποτελέσει την αφετηρία για το σχεδιασμό νέων ενώσεων οι οποίες θα συνδέονται στο κέντρο αναστολής. Μελέτες μοντελισμού προς αυτήν την κατεύθυνση είναι σε εξέλιξη.

ABSTRACT

Diabetes mellitus, one of the most serious hormonal imbalance diseases, is characterised by elevated blood glucose levels. With the aim of treating this pathological state, enzymes and hormone receptors involved in the regulation of glucose levels are used as molecular targets for the structure-based design of potential hypoglycaemic drugs. Previous studies have shown that hepatic glycogen phosphorylase represents an important molecular target for the design of novel hypoglycaemic drugs.

In this study, we purified glycogen phosphorylase b (GPb) from rabbit skeletal muscles and examined with kinetic experiments the effect of polyphenolic extracts from the industrial processing of pomegranate and grape in its enzymatic activity. In specific, kinetic experiments, performed in the direction of glycogen synthesis, showed that extracts reduced the enzyme activity to 50% (IC₅₀ values) at significantly low concentrations. It was found that the pomegranate extract was a potent inhibitor of the enzyme. In order to identify the active ingredient of the extract we perform crystallographic experiments with GPb crystals soaked with pomegranate extract. These experiments identified gallic acid as the active ingredient since it was found bound at the inhibitor center of the enzyme. Structural analysis of the GPb-extract complex revealed the molecular basis of the enzyme inhibition. Gallic acid upon binding forms hydrogen bonds and participates in van der Waals interactions with protein residues. This study could be the starting point for the design of new more potent compounds, for the inhibitor binding site and modeling studies are currently underway towards this direction.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ :

- Γρηγοροπούλου Ε. & Φιλипπόπουλος Κ., (1998). Τεχνική Χημικών Διεργασιών, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα.
- GUYTON & HALL, Ιατρική Φυσιολογία, Έκδοση 11^η, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα.
- Δασκαλάκη Α. Ελένη. (2009). Σχεδίαση, Ανάπτυξη και In silico Συγκριτική Αξιολόγηση Ελεγκτών Κλειστού Βρόχου για Άτομα με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 1, ΕΜΠ.
- Ζωγράφος Σ. Ε. (2000). Κρυσταλλογραφικές και κινητικές μελέτες των ενεργών και ανενεργών διαμορφώσεων της γλυκογονικής φωσφορυλάσης: Δομικός και καταλυτικός ρόλος του συνενζύμου 5-φωσφορικής πυριδοξάλης, αλλοστερική ρύθμιση του ενζύμου και μοριακή αναγνώριση. Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ.
- Kensal E. Van Holde, W. Curtis Johnson, P. Shing Ho, (2010), ΒΙΟΦΥΣΙΚΗ- αρχές φυσικής βιοχημείας, Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ, Αθήνα.
- McMurry J. (2001). Οργανική Χημεία, Τόμοι I & II, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Οικονομάκος Ν. Γ. (1977). Χημική τροποποίηση ενός αλλοστερικού ενζύμου, Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ.
- Οικονομάκος Ν. Γ. (2001), Σχεδιασμός νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, *Χημικά Χρονικά*, 63, 258-261
- Σμοκοβίτης Α., (2004), Φυσιολογία, Έκδοση 4^η, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.
- Stryer L., (1997), Βιοχημεία, Τόμος I, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Τσαγκάρης Γ., (1999), Εργαστηριακές ασκήσεις φυσικοχημείας, Σειρά 1, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα.
- Τσιτσάνου Α., (2001), Διδακτορική διατριβή, Σχεδιασμός αναστολέων της γλυκογονικής φωσφορυλάσης ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα: Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες.
- Χαμόδρακας Σ., (1993), Θέματα Μοριακής Βιοφυσικής, Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα.

EENH:

- Acharya R. & Rees A. R. (1997). Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine, Volume 6, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Federal Republic of Germany, 275-282.
- Apostolou A., Stagos D., Galitsiou E., Spyrou A., Haroutounian A., Portesis N., Trizoglou I., A. Wallace Hayes, Tsatsakis A. M., Kouretas D., (2013), Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of Vitis vinifera stem extracts, Food and Chemical Toxicology.
- Barford D., Hu S. H. & Johnson L. N. (1989). The allosteric transition of glycogen phosphorylase, *Nature* 340, 609-616.
- Blundell T. L. & Johnson L. N. (1976). Protein Crystallography, Academic Press, London.
- Blundell T. L., Jhoti H. & Abell C., (2002), High-throughput crystallography for lead discovery in drug design, Nature Reviews, Drug Discovery, Volume 1.
- Brunger A. T., (1992), Free R value - a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystals. *Nature*, 355, 472-475.
- Brunger, A.T., (1993), Assessment of phase accuracy by cross validation: the free R value. Methods and applications. *Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr.* 49, 24-36.
- Brunger A. T., Adams P. D., Clore G. M., DeLano W. L., Gros P., Grosse-Kunstleve R. W., Jiang J. S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N. S., Read R. J., Rice L. M., Simonson T. & Warren G. L., (1998), Crystallography and NMR system; A new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr.*, 5, 802-810.
- CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4), (1994), The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr.*, D50, 760-763.
- Cori C. F. & Cori G. T., (1936), Mechanism of formation of hexosemonophosphate in muscle and isolation of a new ester, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 34, 702-705.
- Davis A.M., Teague S.J. and Kleywegt G.J. (2003), Application and Limitations of X-ray Crystallographic Data in Structure-Based Ligand and Drug Design. *Angew.Chem. Int. Ed.*, 42, 2718-2736.
- Diamond J., (2003), The double puzzle of diabetes, *Nature*, 423, 599-602.
- Drenth, J., 2002, Principles of protein x-ray crystallography, Springer, New York.
- Fiske C. H. & Subbarow Y., (1925), The colorimetric determination of phosphorous, *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400.
- Fletterick R. J. & Madsen N. B., (1980), The structures and related functions of phosphorylase α , *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 31-61.
- Johnson L. N. & Hajdu J., (1989), Synchrotron studies on enzyme catalysis in crystals, *Biophysics & Synchrotron Radiation*, Hasnain S. ed, 142-155, Ellis Horwood, Chichester.
- Kurukulasuriya R., Link J.T., Madar D.J., Pei Z., Richards S.J., Rohde J.J., Souers A.J. and Szczepankiewicz B.G. (2003). Potential drug targets and progress towards pharmacologic inhibition of the hepatic glucose production. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 123-153.

- Leatherbarrow, R. J., (1997), Using linear and non-linear regression to fit biochemical data, *TIBS*, 15, 455-458.
- Martin J. L., Johnson L. N. & Withers S. G., (1990), Comparison of the binding of glucose and glucose-1-phosphate derivatives to T state glycogen phosphorylase b, *Biochemistry*, 29, 10745-10757.
- McArdle W. D., Katch F. I. & Katch V. L., (2000), *Essentials of Exercise Physiology*, Τόμος Ι, Έκδοση 2^η, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π. Χ.
- McLaughlin, P.J., Stuart, D.I., Klein, H.W., Oikonomakos, N.G., and Johnson, L.N. (1984). Substrate-cofactor interactions for glycogen phosphorylase b: a binding study in the crystal with heptenitol and heptulose-2-P. *Biochemistry* 23, 5862-5873.
- McPherson, A., (1997), *Crystallization of biological macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Melpidou A. E. & Oikonomakos N. G., (1983), Effects of glycose-6-P on the catalic and structural properties of glycogen phosphorylase α , *FEBS Lett.*, 154, 105-110.
- Monod J., Changeux J-P. & Jacob F., (1963), Allosteric Proteins and Cellular Control Systems, *J. Mol. Biol.*, 6, 306-329.
- Monod J., Wyman J. & Changeux J-P., (1965), On the nature of allosteric transitions: a plausible model, *J. Mol. Biol.*, 12, 88-118.
- Oikonomakos N. G., Melpidou A.E & Johnson L. N., (1985), Crystallization of pig skeletal phosphorylase b. Purification, physical and catalic characterization, *Biochem. Biophys. Acta*, 832, 248-256.
- Oikonomakos N. G., Acharya K. R. & Johnson L. N., (1992), Post-Translational Modifications of Proteins, Harding J. J. & Crabbe M. J. C. eds, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 81-127.
- Oikonomakos, N.G., Zographos, S.E., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E. and Johnson, L.N. (2000a). Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J. Biol. Chem.* 275, 34566-34573.
- Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., Gavalas, N.G. and Johnson, L.N. (2000b). A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure* 8, 575-584.
- Oikonomakos, N.G. (2002), Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: 561–586
- Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Somsák L., Nagy, V., Praly, J.-P., Docsa, T., Tóth, B. and Gergely, P., (2002), The binding of N'-acetyl- and Benzoyl-N'- β -D-glucopyranosyl ureas to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem.* 269, 1684-1696.
- Oikonomakos, N. G.; Somsak, L. *Curr. Opin. Invest. Drugs* (2008), 9, 379.
- Rath V.L., Amimirati M., Danley D.E., Ekstrom J.L., Gibbs E.M., Hynes T.R., Mthinowetz A.M., McPherson R.K., Olson T.V., Treadway J.L. and Hoover D.J., (2000), Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at new allosteric site. *Chemistry and Biology*, 7, No 9, 677-682.
- Rhodes G, (1993), *Crystallography made crystal clear*, Academic Press Inc., London.
- Rossman, M.G., Arnold, E., (2001), *International Tables of Crystallography*, Vol. F, The international union of crystallography.

- Saheki, S., Takeda, A. & Shimazu, T., (1985), Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity, *Anal. Biochem.*, 148, 277-281.
- Segel, L.H., (1975), *Enzyme kinetics*, Wiley interscience, New York.
- Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. (2008), New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents, *Curr. Med. Chem.*, 15, 2933-2983
- Sprang S. R., Goldsmith E. J., Fletterick R. J., Withers S. G. & Madsen N. B., (1982), Catalytic site of glycogen phosphorylase: Structure of the T state and specificity for α -D-glucose, *Biochemistry*, 21, 5364-5371.
- Taylor, G., 2003, The phase problem *Acta Crystallogr.*, D59, 1881-1890.
- Tsirkone G.V, Tsoukala E. , Lamprakis C. , Manta S. , Hayes M. J., Skamnaki T. V., Drakou C., Zographos E. S., Komiotis D, Leonidas D.D., 2010, 1-(3-Deoxy-3-fluoro-b-D-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 3413–3425.
- Wild S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree, H. King, “Global Prevalence of Diabetes”, *Diabetes Care*, Vol.27/5, May 2004
- Woods S., T. Lutz, N. Geary, W. Langhans, “Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin”, *Phil. Trans. R. Soc. B* 2006 361, 1219-1235, June 2006
- Witters L. A. & Avruch J., 1978, Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase, *Biochemistry*, 17, 406-410.